

Identifizierung genetischer Läsionen in der Progression und Metastasierung von Bronchialkarzinomen



[PDF-Version]

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biochemikerin Simone Petersen geb. Bräuer

geb. am 24.01.72 in Cottbus

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. H. Meyer

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. J.P. Rabe

Gutachter: 1.Prof. Saumweber
 2. PD Dr. Scherneck
 3. Prof. Birchmeier

Datum der Verteidigung: 17. 8. 99

Zusammenfassung

Um chromosomale Veränderungen zu untersuchen, die mit dem metastatischen Phänotyp assoziiert sind, zu identifizieren, wurde die Comparative Genomische Hybridisierung (CGH) an Plattenepithelkarzinomen der Lunge durchgeführt. Der statistische Vergleich zwischen metastasierten und nicht-metastasierten Tumoren legte nahe, daß Deletionen von 3p12, 4p16, 6p22-p24, 6q24-q26, 8p21-p23, 10q und 21q22 sowie DNA-Gewinne bei 1q21-q25, 8q, 9q34, 11q13 und 15q11-q13 signifikant mit der Metastasierung assoziiert waren.

Ausgedehnte Allelotypisierungsstudien konnten 3 minimale Deletionsregionen auf Chromosom 10q nachweisen. Die Untersuchung der Kandidatengene PTEN/MMAC1, MXI1 und DMBT1 in diesen Bereichen war jedoch negativ. Zur Identifizierung neuer Kandidatengene in der Lungenkrebs-Progression zu identifizieren, wurde die Subtraktive Suppressions-Hybridisierung (SSH) eingesetzt. Der Expressionsvergleich einer metastasierten Adenokarzinomzelllinie mit einer Primärkultur normaler Lungenepithelzellen resultierte in der Klonierung von 2 cDNA-Bibliotheken mit insgesamt 752 Klonen, welche sequenziert und im Northern Blot auf differentielle Expression untersucht wurden. In weniger als 40% zeigten sich Homologien zu bereits bekannten Genen.

Die weitere Analyse eines unbekannten cDNA-Fragmentes führte zur Klonierung und Charakterisierung eines neuen Genes, welches das humane Calcyclin-bindende Protein kodiert, auf Chromosom 1q24-q25. Die Überexpression dieses Genes in Lungenkarzinomzelllinien sowie die Aufdeckung intra- und interchromosomaler Rearrangements mittels Fluoreszenz- in situ-Hybridisierung (FISH) weist auf eine mögliche Bedeutung in der Progression von Lungenkarzinomen hin.

Schlagwörter: Lungenkarzinome, Genetik, Metastasierung, Progression

Abstract

To identify chromosomal imbalances associated with the metastatic phenotype Comparative Genomic Hybridization (CGH) was applied to squamous cell carcinomas of the lung. The comparison of metastatic and non-metastatic tumors suggested that deletions of 3p12, 4p16, 6p22-p24, 6q24-q26, 8p21-p23, 10q, and 21q22 as well as DNA gains of 1q21-q25, 8q, 9q34, 11q13, and 15q11-q13 were significant associated with the metastasis formation. Extensive allelotyping studies revealed 3 minimal deleted regions of chromosome 10q. The mutational analysis of the three candidate genes PTEN/MMAC1, MXI1, and DMBT1 located near these regions was negative. To isolate new candidate genes involved in lung cancer progression suppression subtractive hybridization (SSH) was used. The comparison of the expression pattern of a metastatic lung adeno carcinoma cell line with a primary culture of normal airway epithelial cells resulted in the cloning of 752 cDNA fragments which were sequenced and investigated by Northern blot hybridization. The sequence comparison showed homology to known genes in less than 40%.

The further investigation led to the cloning and characterization of a new gene encoding the human Calcyclin-binding protein on chromosome 1q24-q25. The gene was overexpressed in a panel of lung cancer cell lines and showed intra- and interchromosomal rearrangements using fluorescence in situ- hybridization (FISH) suggesting the involvement of this gene in lung cancer progression.

Keywords: lung cancer, genetics, metastasis formation, progression

1	Einleitung	6
1.1	Epidemiologie von Lungenkarzinomen	6
1.2	Kanzerogenese und genetische Suszeptibilität	7
1.3	Genetische Veränderungen in Lungenkarzinomen	8
1.4	Zeitlicher Ablauf genetischer Veränderungen in der Tumorigenese von Lungentumoren	18
1.5	Tumorprogression und Metastasierung	20
2	Material	22
2.1	Puffer und Lösungen	22
2.2	Medien	23
2.3	Zelllinien	25
2.4	Tumormaterial	26
3	Methoden	27
3.1	Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)	27
3.1.1	Indirekte Markierung von DNA mittels Nicktranslation	28
3.1.2	Hybridisierung	29
3.1.3	Detektion	30
3.1.4	Bildaufnahme	31
3.1.5	Statistische Auswertung	32
3.2	Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung von PAC-Klonen	33
3.2.1	Metaphasenpräparation von Tumorzellen	33
3.3	Isolation von genomischer DNA	35
3.4	Restriktionsverdau	36
3.5	DNA-Agarose-Gelelektrophorese	36
3.6	Southern Blotting	37
3.7	Allelotypisierung	37
3.8	SSCP-Analyse	38
3.9	Direkte Sequenzierung von PCR-Produkten	40
3.10	RNA-Präparation aus Zellen	40
3.11	RNA-Präparation aus Gewebe mittels QIAGEN-RNeasy Mini Kit	41
3.12	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	42

3.13 Northern Blotting	43
3.14 Radioaktive Markierung von Sonden	43
3.15 Radioaktive Hybridisierung von Northern- und Southern-Blots	44
3.16 cDNA-Synthese	44
3.17 Klonierung von PCR-Fragmenten	45
3.18 Plasmidpräparation	46
3.19 Automatische Sequenzierung	48
3.20 PolyA-RNA-Isolierung	49
3.21 Erstellung von Expressionsbibliotheken	50
4 Ergebnisse	54
4.1 Chromosomale Veränderungen in metastasierten und nicht-metastasierten Plattenepithelkarzinomen der Lunge	54
4.2 Allelverluste auf Chromosom 10q in der Progression und Metastasierung von Lungenkarzinomen	58
4.3 Mutationsanalyse der Kandidatengene MXI1, PTEN/MMAC1 und DMBT1 auf Chromosom 10	60
4.4 Differentiell exprimierte Gene in Lungenkarzinomzelllinien	63
4.5 Charakterisierung des Genes für das humane Calcyclin-bindende Protein	71
5 Diskussion	81
5.1 CGH-Ergebnisse	81
5.2 Genetische Untersuchungen auf Chromosom 10q	87
5.3 Differentielle Genexpression	89
5.4 Gen für das Calcyclin-bindende Protein	95
5.5 Ausblick	96
6 Zusammenfassung	98
Abkürzungen	100
Literaturverzeichnis	102
Danksagung	125
Erklärung über die Selbständigkeit bei der Anfertigung der Arbeit	126
Publikationsliste	127

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie von Lungenkarzinomen

Lungenkarzinome sind die häufigste krebs-assoziierte Todesursache in westlichen Ländern (de Vita et al, 1997). Die Unterteilung der Lungentumoren erfolgt in zwei Hauptgruppen, kleinzellige (SCLC, small cell lung cancer) und nichtkleinzellige (NSCLC, non-small cell lung cancer) Lungenkarzinome. SCLC umfassen etwa 15-20%. Demgegenüber überwiegen die nichtkleinzelligen Bronchialkarzinome mit 75-80%. Sie stellen eine histologisch heterogene Gruppe dar mit den drei wichtigsten Subtypen Plattenepithel- (30%), Adeno-(40%) sowie großzellige Lungenkarzinome (15%). Während sich Kleinzeller und Plattenepithelkarzinome in den proximalen Atemwegen und den Bronchien entwickeln, nehmen Adenokarzinome und großzellige Lungenkarzinome gehäuft in den peripheren Bronchiolen und Alveolen ihren Ausgang. Nicht geklärt ist, ob sich SCLC und NSCLC aus denselben Ausgangszellen entwickeln. Da Kleinzeller eine neuroendokrine Differenzierung zeigen, wird angenommen, daß sie aus den relativ seltenen normalen neuroendokrinen Zellen innerhalb des Bronchialepithels, den sogenannten Kulschitzky-Zellen, entstehen.

Die Unterteilung in kleinzellige und nichtkleinzellige Lungenkarzinome hat insbesondere klinische Relevanz. So zählen Kleinzeller zu den malignesten Tumoren beim Menschen überhaupt und zeichnen sich unbehandelt durch einen rasch progredienten Verlauf aus. Die meisten Patienten haben bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Hinweis auf systemische Metastasen und werden deshalb sehr selten chirurgisch behandelt. Zumeist sind kombinierte Radio- und Chemotherapie die Behandlungsweise erster Wahl. Trotz dem initial guten Ansprechen auf diese Therapie ist die 5-Jahres-Überlebensrate mit 5% sehr schlecht.

Nichtkleinzellige Lungentumoren werden in erster Linie chirurgisch behandelt. Die Prognose der Patienten hängt dabei entscheidend vom Stadium zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ab. Für Patienten mit frühen Tumorstadien zum Zeitpunkt der Diagnose und vollständiger chirurgischer Entfernung des Tumors, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate ungefähr bei 50 % (Williams et al, 1981). Für Patienten mit nicht-operablem NSCLC mit rekurrenter Erkrankung, Chemo- und Radiotherapie liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 35% mit mittlerer Überlebenszeit von nur 25 Wochen (Bonomi et al, 1996).

Tab.1: Vergleich klinisch-pathologischer Parameter zwischen NSCLC und SCLC

	Kleinzellige Lungenkarzinome	Nichtkleinzellige Lungenkarzinome
Inzidenz	15-20%	75-80%
neuroendokriner Phänotyp	100%	LCNECs, Karzinoide
Strahlungssensitivität	hoch	niedrig
Chemosensitivität	hoch	niedrig

1.2 Kanzerogenese und genetische Suszeptibilität

Etwa 90% aller Patienten entwickeln Lungentumoren durch Exposition zum Tabakrauch. Die drei Hauptklassen von Kanzerogenen im Tabakrauch sind polyzyklische Kohlenwasserstoffverbindungen (v.a. Benzo[a]pyren), Nitrosamine und aromatische Amine. Die kanzerogenen Effekte beinhalten die Induktion Karzinogen-aktivierender und -inaktivierender Enzyme sowie die Formation kovalenter DNA-

Addukte, welche zu Fehlern bei der DNA-Replikation und somit zu Mutationen führen können (Denissenko et al, 1996).

Es wurden mehrere Studien zu genetischen Polymorphismen in Enzymen von Karzinogen-metabolisierenden Stoffwechselwegen durchgeführt, insbesondere innerhalb des Cytochrom P450-Systems (CYP), welche für die Metabolisierung von Tabak-Karzinogenen und deren Ausscheidung verantwortlich sind. Polymorphismen innerhalb dieser Gene wurden mit unterschiedlichen Graden der metabolischen Kapazität und mit einem erhöhten Lungenkrebs-Risiko assoziiert. Insbesondere Variationen der Enzymaktivitäten in den Enzymen CYP2D6 und CYP1A1 wurden bei betroffenen Patienten gefunden, wobei die Ergebnisse zum Teil widersprüchlich sind (Shields et al, 1993; Caporaso et al, 1989; Shaw et al, 1995). Zusätzlich zu diesen Enzymen, welche kanzerogene Zwischenprodukte bilden können, beeinflussen auch Enzyme, die an der Detoxifikation und beschleunigten Ausscheidung toxischer Metaboliten beteiligt sind, das Lungenkrebs-Risiko. Es sei in diesem Zusammenhang die Glutathion-S-Transferase (GST) genannt. Fehlende oder reduzierte Aktivität der M1-Isoform bei einem *GSTM1-null*-Genotyp wurden über Kopplungs-Analysen mit erhöhter Suszeptibilität korreliert (To et al, 1996).

Während zweifellos die Mehrzahl der Lungentumoren auf Nikotinabusus zurückzuführen sind, sprechen epidemiologische Studien eindeutig für eine familiäre Häufung von Lungenkrebs (Ooi et al, 1986; Sellers et al, 1990; Schwartz et al, 1996), die auf hereditäre Faktoren zurückgeführt wird.

1.3 Genetische Veränderungen in Lungenkarzinomen

Viele Wachstumsfaktoren oder regulatorische Peptide und deren Rezeptoren werden

in Tumor- und normalem Lungengewebe exprimiert und lassen vermuten, daß eine Reihe autokriner bzw. parakriner Wachstumsstimulationsprozesse bei Lungenkarzinomen eine Rolle spielen (Viallet & Sausville, 1996). Einige Komponenten dieser Signaltransduktionskaskaden wurden initial als Proto-Onkogene identifiziert, welche durch unterschiedliche genetische Mechanismen abnormal aktiviert werden. Diese Produkte umfassen Wachstumsfaktoren, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, Membran-assoziierte G-Proteine, cytoplasmatische Serin/Threonin-Kinasen und nukleäre Transkriptionsfaktoren.

Die am besten charakterisierte autokrine Schleife in Lungentumoren beinhaltet das Gastrin-releasing Peptid und andere Bombesin-ähnliche Peptide (GRP/BN) und ihre Rezeptoren. GRP/BN wurden mit einem weiten Spektrum physiologischer Effekte in Zusammenhang gebracht, u.a. der Regulation von Sekretion, Wachstum und Neuromodulation. Immunhistologische Studien zeigten, daß 20-60% der kleinzelligen Lungenkarzinome GRP exprimieren, Nichtkleinzeller hingegen weit weniger häufig (Richardson & Johnson, 1993). Die Expression mindestens eines der drei GRP/BN-Rezeptoren wurde in einer Vielzahl von klein- als auch nichtkleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien beschrieben (Fathi et al, 1996).

Neureguline (Neu differentiation factors, NDF's, heregulins) sind Peptid-Wachstumsfaktoren, die mit der ERBB-Familie der Transmembran-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (ERBB2, ERBB3, ERBB4) interagieren (Alroy & Yarden, 1997). Neuregulin und die ERBB-Familie stellen eine weitere potentielle Wachstums-stimulierende Schleife in Lungentumoren dar (Rachwal et al, 1995). Amplifikation und Überexpression von ERBB2 (HER2/neu) auf Chromosom 17q21 spielen eine Rolle in Tumorigenese von Brust- und Ovarialtumoren. Obwohl ERBB2-Amplifikationen relativ selten in Lungentumoren sind, ist ERBB2 in mehr als einem Drittel der

Nichtkleinzeller, insbesondere in Adenokarzinomen, überexprimiert (Schneider et al, 1989; Shi et al, 1992; Weiner et al, 1990).

ERBB1 (epidermal growth factor receptor; EGFR) reguliert die epitheliale Proliferation und Differenzierung. Die Aktivierung in Lungentumor-Zellen erfolgt gewöhnlich mittels Überexpression ohne Amplifikation. Es ist häufiger in Nichtkleinzellern als in Kleinzellern und möglicherweise an Tumorstadium und Differenzierung gebunden (Tateishi et al, 1990; Damstrup et al, 1992). Zu den Liganden dieses Rezeptors gehören TGF α (transforming growth factor- α) und EGF (epidermal growth factor). Die Produktion dieser Faktoren, insbesondere von TGF α , und den entsprechenden Rezeptoren in Lungenkarzinom-Zellen sprechen wiederum für eine autokrine Stimulation (Rachwal et al, 1995; Tateishi et al, 1990; Rusch et al, 1993).

Das kit-Proto-Onkogen, ein weiterer Tyrosin-Kinase-Rezeptor, und sein Ligand SCF (stem cell factor) sind in vielen kleinzelligen Bronchialkarzinomen gleichzeitig exprimiert, was den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil bietet und zur Chemo-Sensitivität der Kleinzeller beitragen könnte (Sekido et al, 1993; Krystal et al, 1996).

Weiterhin findet sich die Co-Expression von PDGF (platelet-derived growth factor), dem Produkt des Proto-Onkogens v-sis, und dessen Rezeptor (PDGFR) in Lungentumoren (Antoniades et al, 1992).

Tab.2: Vergleich genetischer Parameter zwischen NSCLC und SCLC

Kleinzellige Lungenkarzinome	Nichtkleinzellige Lungenkarzinome
---------------------------------	--------------------------------------

ras-Mutationen	<1%	20-50%
myc-Amplifikationen	18-30%	8-20%
BCL-2-Expression	75-95%	10-35%
mögl. autokrine Schleifen	GRP/GRP-Rez.; SCF/KIT	HGF/MET; NDF/ERBB
p53-Mutationen	75-100%	50%
abnorme p53-Expression	40-70%	40-60%
pRB-Verlust	>90%	15-40%
p16-Mutationen	<1%	10-40%
fehlende p16-Expression	0-10%	30-70%
CyclinD1	keine Angaben	~45%

HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor), welcher in normaler Lunge sehr gering exprimiert ist, stimuliert epitheliale Zellen zur Proliferation, Bewegung und komplexen Differenzierung, wie Morphogenese und Angiogenese (Birchmeier et al, 1998). Während der vom met-Proto-Onkogen kodierte HGF-Rezeptor generell in normalem Lungengewebe, Kleinzellern und Nichtkleinzellern exprimiert ist, findet sich erhöhte HGF-Expression nur in Nichtkleinzellern (Olivero et al, 1996) und ist dort mit schlechter Prognose korreliert (Siegfried et al, 1997).

Die ras-Genfamilie (K-ras, H-ras, N-ras) ist häufig durch Mutationen aktiviert. Im Gegensatz zu Kleinzellern, die kaum Mutationen aufweisen, zeigen abhängig vom Kollektiv und der Detektionsmethode bis zu 50% der Nichtkleinzeller Mutationen (Richardson & Johnson, 1993; Clements et al, 1995). Etwa 90% aller ras-Mutationen betreffen das K-ras-Gen, davon treten 85% im Codon 12 auf.

K-ras-Mutationen treten in besonders hoher Frequenz in Adenokarzinomen (20-30%)

auf, seltener in Plattenepithelkarzinomen. Das Auftreten von ras-Mutationen in Nichtkleinzellern wurde als negativer prognostischer Faktor beschrieben (Slebos et al, 1988; Li et al, 1994; Rosell et al, 1993; Rodenhuis et al, 1992). Interessanterweise sind 70% aller K-ras-Mutationen G->T Transversionen, wie sie auch im p53-Gen vorkommen und durch Einwirkung von polyzyklischen Kohlenwasserstoffen entstehen (siehe unten).

RAS erhält Signale von GRB2- und SOS-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und ist ein GTP-bindendes Protein mit intrinsischer GTPase-Aktivität, wobei gebundenes GTP zu GDP hydrolysiert wird. GTP-gebundenes RAS stellt dabei die aktive Form dar, wodurch Wachstumssignale an den Zellkern weiterleitet. Nach der Hydrolyse zu GDP fällt es in die inaktive Konfiguration. Durch Mutationen im ras-Gen, verliert das mutierte Protein, die Fähigkeit der Hydrolyse des gebundenen GTP und sendet als Folge dauerhafte Wachstumssignale an die Zelle.

Die RAS-Signaltransduktionskaskade resultiert ultimativ in der Aktivierung von Proto-Onkogenen im Zellkern.

Das myc-Gen ist ein solches Proto-Onkogen, welches zu der amphiphilen Klasse von Transkriptionsfaktoren (Helix-Knick-Helix-Motiv und Leucin-Reißverschluß) zählt. Es ist funktionell als MYC-MAX-Heterodimer aktiv und bindet mit hoher Affinität an CACGTG-Konsensus-Sequenzen, was zur Transkriptions-Aktivierung von in der Signaltransduktionskaskade abwärts gelegenen Genen führt. MYC ist beteiligt am normalen Zell-Wachstum und der Proliferation über die direkte Aktivierung von Genen der DNA-Synthese, vom RNA-Metabolismus und der Zellzyklus-Regulation (Grandori & Eisenman, 1997).

Während eine Aktivierung von MYC sowohl in Kleinzellern als auch in Nichtkleinzellern in der Tumorigenese eine Rolle spielen, kommen Veränderungen

von MYCN und MYCL lediglich in Kleinzellern vor. Die Aktivierung der myc-Proto-Onkogene erfolgt durch Amplifikation oder transkriptionelle Deregulation (Krystal et al, 1988). In mehreren Studien konnten in insgesamt 18% bis 31% der Kleinzeller sowie in 8% bis 20% der Nichtkleinzeller (jeweils Primärtumoren und Zelllinien) myc-Amplifikationen nachgewiesen werden (Richardson & Johnson, 1993).

BCL-2 und p53 sind Schlüsselmoleküle in der Apoptose normaler Zellen. Der programmierte Zelltod wird unter bestimmten Bedingungen, z.B. DNA-Schädigung, eingeleitet. Dieser Weg scheint in einer Vielzahl von Tumorzellen, so auch in Lungentumoren, funktionell beeinträchtigt zu sein. Immunhistologische Untersuchungen zeigten, daß in 75-95% der Kleinzeller das BCL-2-Protein exprimiert ist (Jiang et al, 1995; Kaiser et al, 1996). BCL-2-Expression findet sich häufiger in Plattenepithelkarzinomen (25-35%) als in Adenokarzinomen (10%). Insgesamt ist es in Nichtkleinzellern mit einer neuroendokrinen Differenzierung korreliert (Jiang et al, 1996; Pezzella et al, 1993). Eine inverse Korrelation zwischen BCL-2-Expression und abnormer p53-Expression in Nichtkleinzellern führte zu der Hypothese, daß zur Modulation der Apoptose entweder BCL-2-Überexpression oder p53-Mutationen hinreichend ist (Fontanini et al, 1995; Kitagawa et al, 1996). Dies steht im Gegensatz zu kleinzelligen Lungentumoren, bei denen beide Faktoren gemeinsam alteriert sein können.

Das sicherlich am besten charakterisierte Tumorsuppressorgen in Lungentumoren ist p53. Neben häufig auftretenden Allelverlusten (loss of heterozygosity, LOH) auf Chromosom 17p13.1, wo das p53-Gen lokalisiert ist, finden sich Mutationen im zweiten Allel in 75-100% von SCLC und ungefähr 50% der NSCLC (Greenblatt et al, 1994). Immunhistologische Studien zeigten eine abnorme p53-Expression in 40-70% der Kleinzeller und 40-60% der Nichtkleinzeller (Brambilla et al, 1996; Eerola et al,

1997; Nishio et al, 1996; Konishi et al, 1997). Die am häufigsten auftretenden Mutationen im p53-Gen sind G->T Transversionen, wie sie insbesondere nach Bildung von DNA-Addukten durch Kanzerogene im Tabakrauch induziert werden. Darüber hinaus konnte die Entstehung dieser Addukte innerhalb des p53-Genes in Bronchialepithelzellen durch Inkubation mit Benzo[a]pyren erzeugt werden, welche interessanterweise genau in häufig mutierten Regionen (sogenannten „hotspots“) lagen (Denissenko et al, 1996). Die bisher veröffentlichten Studien zur Korrelation von p53-Status und klinischer Prognose sind kontrovers (Graziano, 1997).

Der p16-CyclinD1-CDK4-RB-Weg ist ein zentraler Bestandteil des Übergangs von der G1 in die S-Phase im Zellzyklus. Mindestens eines dieser vier Gene ist gewöhnlich in Lungentumoren mutiert.

CyclinD1 ist eine Kinase, die über die Hyper-Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins und daraus resultierender Freisetzung von Transkriptionsfaktoren, die die Replikation von S-Phase-Genen einleitet. Das Proto-Onkogen cyclinD1 ist auf Chromosom 11q13 lokalisiert. In ca. 15% der nichtkleinzelligen Lungentumoren finden sich Amplifikationen von cyclinD1 und CyclinD1-Überexpression zeigen ungefähr 45%. Diese Überexpression wurde mit einer schlechten Prognose assoziiert (Tanaka et al, 1998; Betticher et al, 1996).

Das Retinoblastoma-Gen (RB) ist auf Chromosom 13q14 lokalisiert und kodiert ein nukleäres Phosphoprotein. Es hat im nativen Zustand Wachstums-supprimierende Funktion durch Inhibition des Übergangs der G1- in die S-Phase. Kürzlich wurde gezeigt, daß der RAS-Pathway funktionell an die Zellzyklus-Regulation über RB gekoppelt ist (Peeper et al, 1997). RB-Mutationen zusammen mit Verlust des anderen Allels wurden in Lungentumoren beschrieben (Harbour et al, 1988; Horowitz et al, 1990). Abnorme Proteinexpression findet sich in über 90% der SCLC und in 15-

40% der NSCLC (Reissmann et al, 1993; Cagle et al, 1997; Xu et al, 1991). Mutationen in RB waren bei NSCLC häufiger in fortgeschrittenen Tumoren (Xu et al, 1994).

Die weniger häufige Deaktivierung von RB in NSCLC läßt andere Wege der Inaktivierung der RB-vermittelten Zellzyklus-Kontrolle vermuten. Das p16^{INK4}-Protein ist ein Zellzyklus-Modulator, der die RB-Funktion über Inhibierung der CDK4:CyclinD1-Kinase-Aktivität reguliert und stellt das dritte Ziel für Mutationen innerhalb des Zellzyklusweges in Lungentumoren dar. P16^{INK4}-Alterationen treten insbesondere in NSCLC auf, während sie in Kleinzellern eher selten sind. In 30-40% der NSCLC wurden homozygote Deletionen bzw. Punktmutationen beschrieben (Washimi et al, 1995; Shimizu et al, 1995; Rusin et al, 1996). Fehlende Expression auf RNA bzw. auf Proteinebene wurde in 30-70% der untersuchten Lungentumoren beschrieben. In Tumoren ohne nachweisbare Mutationen wurde als mögliche Ursache der fehlenden Expression von p16^{INK4} die Hypermethylierung im 5'-CpG-Bereich des Promotors und daraus resultierende transkriptionelle Herabregulation im erhaltenen Allel diskutiert (Merlo et al, 1995; Otterson et al, 1995). Zusammenfassend spielen p16-Mutationen eher in NSCLC und RB-Inaktivierung präferenziell in SCLC eine Rolle. Während eine Inaktivierung von beiden Genen, RB und p16, gleichzeitig ungewöhnlich ist, sind CyclinD1-Überexpressionen zusätzlich möglich (Shapiro et al, 1995).

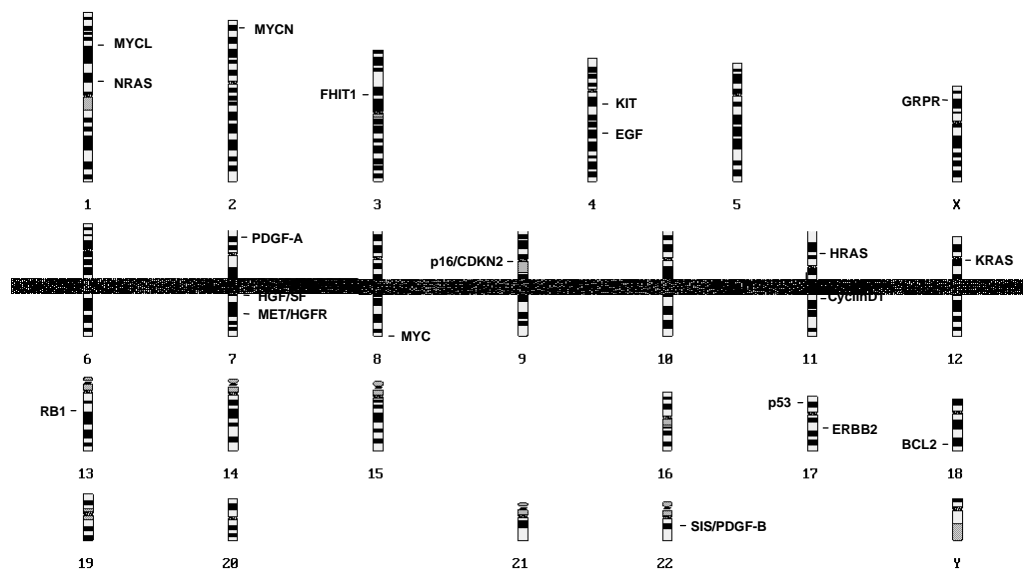


Abb.1 Chromosomale Lokalisation wichtiger Onko- und Tumorsuppressorgene in Lungentumoren. Proto-Onkogene sind rechts, Tumorsuppressorgene sind links neben den Chromosomenideogrammen dargestellt.

Cytogenetische Untersuchungen sowie Allelotypisierungsstudien haben neben Regionen mit bereits bekannten und gut charakterisierten Tumorsuppressorgenen auch solche gefunden, bei denen der zugrundeliegende genetische Defekt noch nicht aufgeklärt ist. Die am häufigsten auftretende Veränderung ist die Deletion einer Kopie von Chromosom 3p in mehr als 90% der SCLC bzw. mehr als 80% der NSCLC, welche auf die Existenz mehrerer Tumorsuppressorgene hindeutet. Die Allelotypisierungsanalyse mit mehreren Markern impliziert mindestens die drei Regionen 3p25-p26, 3p21.3-22 und 3p14-cen (Hibi et al, 1992). In Lungentumorzelllinien wurden 5 separate homozygote Deletionen beschrieben, drei bei 3p21, eine bei 3p12-p13 und eine bei 3p14.2 (Rabbitts et al, 1990; Drabkin et al, 1992; Latif et al, 1992; Todd et al, 1997). Obwohl bereits zahlreiche Kandidatengene

auf Chromosom 3p untersucht wurden, konnte bisher kein Gen mit funktioneller Tumorsuppressor-Aktivität und gehäuften Mutationen in Lungentumoren identifiziert werden. Kürzlich wurde das FHIT-Gen auf Chromosom 3p14.2 beschrieben, welches den fragilen Locus FRA3B überspannt. Aufgrund von häufigen Allelverlusten, homozygoten Deletionen und aberranten Transkripten, stellt es ein Kandidatengen für die Tumorigenese in Lungen dar (Sozzi et al, 1996; Fong et al, 1997; Yanagisawa et al, 1996). Seine Funktion bleibt aber noch zu klären.

Weitere Allelverluste sind für die Regionen 1p, 1q, 2q, 5q, 6p, 6q, 8p, 8q, 10q, 11p, 11q, 14q, 17q, 18q und 22q beschrieben worden (Sekido et al, 1998), welche noch nicht charakterisierte Kandidatengene beherbergen. Häufige Allelverluste auf 13q mit geringerer Inzidenz von RB-Mutationen (Tamura et al, 1997) sowie eine höhere Inzidenz von LOH auf Chromosom 17p13.3 als auf 17p13.1 und entsprechenden p53-Mutationen (Konishi et al, 1998) sprechen außerdem auch für die Existenz weiterer Tumorsuppressorgene auf diesen Chromosomenarmen.

Mit der komparativen genomischen Hybridisierung (CGH) konnten Überrepräsentationen und Amplifikationen auf den folgenden Chromosomen aufgedeckt werden: 1p, 1q, 2p, 3q, 5p, 8q, 11q, 16p, 17q und 19q. Dabei ist lediglich bei den Regionen 1p32 (MYCL), 2p25 (MYCN), 8q24 (MYC) und 11q13 (CycD1) das zugrundeliegende Onkogen bekannt.

1.4 Zeitlicher Ablauf genetischer Veränderungen in der Tumorigenese von Lungentumoren

Vor dem klinisch offenkundigen Lungenkarzinomen treten eine Reihe morphologisch distinkter präneoplastischer Veränderungen des Bronchialepithels auf, welche die Schritte von der Hyperplasie, der Metaplasie, der Dysplasie und dem Carcinoma in situ umfassen (siehe Abb. 2).

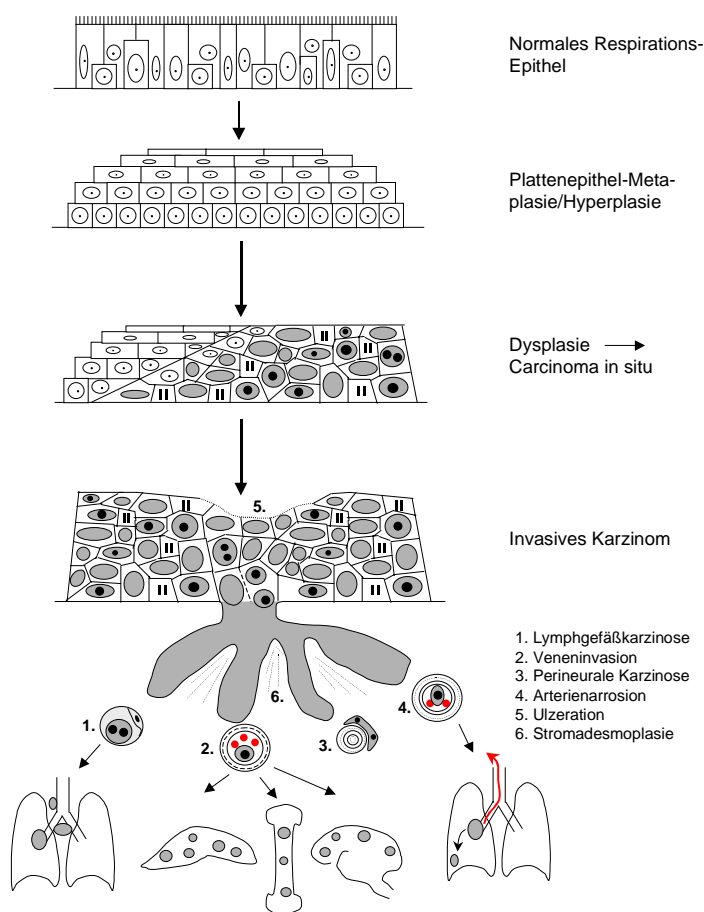


Abb.2 Schematische Darstellung der Bildung eines invasiven Karzinoms mit Metastasierung ausgehend von mehrreihigem Flimmerepithel, über Hyper- und Dysplasie und carcinoma in situ.

An Tumorgewebe angrenzende präneoplastische Zellen zeigen einige genetische Veränderungen, wie sie in typischen Tumorzellen auftreten, wie ras-Mutationen, p53-Immunreaktivität und DNA-Aneuploidie (Nuorva et al, 1993; Bennett et al, 1993; Hirano et al, 1994; Smith et al, 1996; Li et al, 1994). Über Allelotypisierungsstudien und Mutationsanalyse an mikrodissiziertem präneoplastischem Epithel und frühen Tumorstadien konnte nachgewiesen werden, daß 3p-Allelverluste die frühesten Ereignisse sind, gefolgt von 9p- und 17p-Allelverlusten mit p53-Mutationen, 5q-LOH und K-ras-Mutationen (Sundaresan et al, 1992; Chung et al, 1995; Hung et al, 1995; Kishimoto et al, 1995; Sugio et al, 1994).

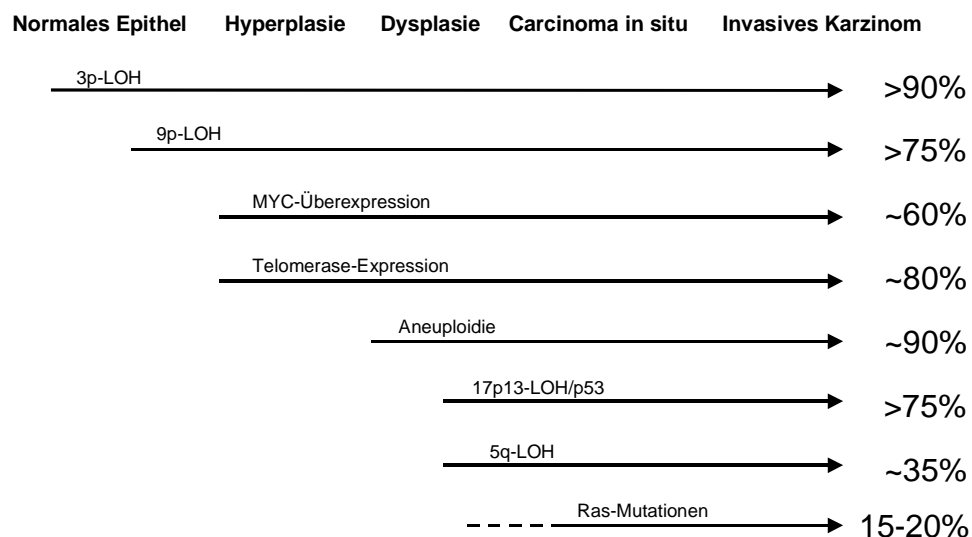


Abb.3 Sequentielle Akkumulation genetischer Veränderungen in der Tumorigenese von nichtkleinzelligen Lungentumoren (nach Sekido et al, 1998)

Diese Beobachtungen stimmen auch mit dem aufgestellten Modell überein, nachdem sich zunächst multiple genetische Mutationen akkumulieren bis es zur Entartung der Zellen kommt.

1.5 Tumorprogression und Metastasierung

Das Hauptproblem bei der Behandlung von Lungenkarzinomen ist zumeist die Metastasierung. Sie entscheidet in der Regel über das Schicksal eines Patienten.

Dabei handelt es sich um einen komplexen Prozeß, der von Seiten der metastasierenden Tumorzelle eine Reihe von Eigenschaften und Fähigkeiten voraussetzt.

Zunächst muß sich die Zelle aus dem Zellverband des Primärtumors lösen und einen Anschluß an das Gefäßsystem suchen. Dabei ist sowohl die lymphogene als auch hämatogene Ausbreitung möglich. Erstere resultiert in der Ausbildung von Lymphknoten-Metastasen, welche zunächst vornehmlich in unmittelbarer Nähe zum Primärtumor auftreten. Bei der Verbreitung über das Blutgefäßsystem kommt es zur Entstehung von Organ-Metastasen. Die hämatogene Disseminierung ist sehr typisch für Lungentumoren. Dabei kann jedes Organ betroffen sein, wobei gehäuft Leber-, Nebennieren-, Gehirn- und Knochenmetastasen auftreten. Während des Transportes im Gefäßsystem hat die Zelle vielfältige mechanische Belastungen sowie Angriffe des Immunsystems zu überstehen und muß letztlich das Gefäßsystem wieder verlassen, sich neu ansiedeln und proliferieren, um eine Tochtergeschwulst auszubilden (Brodt, 1996).

Der Prozeß der Progression und Metastasierung bedarf einer Vielzahl von Veränderungen, wie beispielsweise der Expression von Matrix-degradierenden Enzymen und der Sekretion von Wachstumsfaktoren. Die dabei involvierten Gene spielen wahrscheinlich in mehreren Tumorentitäten eine Rolle.

Viele Veränderungen in der Progression von Lungentumoren sind noch nicht geklärt. Den sich anhäufenden Daten über chromosomale und subchromosomale

Veränderungen steht eine Minderheit an bereits aufgedeckten Kandidatengenegen gegenüber. Zusätzlich erschwert die histologische Vielfalt von Lungentumoren die Erarbeitung progressions-assoziiierter Marker. Ein weiteres Problem ist die histologisch beobachtete Heterogenität dieser Tumorentität, welche in bis zu 30% der Fälle auftritt (Müller & Fisseler-Eckhoff, 1989).

Die Klassifikation der Lungentumoren basiert auf der Histologie und ist morphologisch, d.h. primär deskriptiv, ausgerichtet. Sie kann nur in begrenztem Umfang Aussagen zum biologischen Verhalten des Tumors treffen. Morphologische Parameter, wie hohe mitotische Aktivität, Differenzierungsgrad, intraepitheliales Wachstum, Lymph- und Blutgefäßinvasion, sind zwar wichtige Merkmale in der Beschreibung eines Tumors, sie definieren jedoch nur einen Ist-Zustand.

Das Ziel sollte es sein, Kriterien zu finden, die Aussagen über das maligne Potential eines Tumors erlauben und prädiktiv auf eine wirksame Therapie hinweisen. So könnte beispielsweise bei chirurgisch kurativ operierten Tumoren, die eine erhöhte Malignität aufweisen, eine zusätzliche Chemotherapie durchgeführt werden, in der Hoffnung, klinisch nicht faßbare Mikrometastasen zu zerstören. Gerade solche Kombinationstherapien könnten dazu beitragen, die Mortalitätsrate zu senken.

Die vorliegende Arbeit ist Bestandteil eines Projektes, in dem Korrelationen zwischen genetischen Veränderungen und den Histo- und biologischen Phänotypen erstellt werden und eine genetische Klassifikation von Lungentumoren erarbeitet werden soll. Der hier vorliegende Teil befaßt sich insbesondere mit der Korrelation chromosomaler Veränderungen mit der Progression und dem metastatischen Phänotyp, der Analyse von Kandidatengenegen innerhalb häufig veränderter chromosomaler Regionen und der Aufdeckung neuer Kandidatengene in Lungentumoren.

2 Material

2.1 Puffer und Lösungen

1x TBE: 0,089 M Tris-HCl pH 7,5

0,089 M Borat

0,02 M EDTA

20x SSC: 3 M NaCl

0,3 M Natriumcitrat

20x SSPE: 3,6 M NaCl

0,2 M Natriumphosphat

0,02 M EDTA

pH 7,7

1x PBS: 0,0015 M KH_2PO_4

0,008 M Na_2HPO_4

0,0027 M KCl

0,139 M NaCl

Stop-Lösung: 98% Formamid

 10 mM EDTA

 0,025% Bromphenolblau

DEPC-H₂O: 1 l Aqua bidest.

 1 ml Diethylpyrocarbonat

 über Nacht unter dem Abzug einwirken lassen

 autoklavieren

2.2 Medien

1x LB-Medium: 1% Bacto Tryptone (Difco)

 0,5% Bacto Yeast Extract (Difco)

 1% NaCl

1x LBAgar: LB-Medium mit 1,5 % Bacto Agar (Difco)

YT-Broth-Medium: 1,6% Bacto Tryptone (Difco)

 1% Bacto Yeast Extract (Difco)

 0,5% NaCl

RPMI-Medium: RPMI 1640 (PAA)

10% FKS

1% Glutamin

L15-Medium: 10% FKS

0,5% Glutamin

Waymouth's-Medium: Waymouth MB 752/1 (SIGMA)

pro Liter 29,9 ml Natriumbicarbonat (7,5% w/v)

pH 7,0

10% FKS

McCoys-Medium: McCoys 5A-Medium (GIBCO BRL)

10% FKS

1% Glutamin

Einfriermedium (für humane Zellen):

95% FKS

5% DMSO

2x Bakterien-Einfriermedium:

8,25 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

1,80 g KH_2PO_4

0,45 g Na-Citrat $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,09 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5,90 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

35,75 ml 87%-iges Glycerol

auf 500 ml H_2O auffüllen, autoklavieren

2.3 Zelllinien

Tab. 3: Auflistung der in der Arbeit verwendeten Tumorzelllinien

Name	Diagnose	Herkunft	Medium
H526	Kleinzeller	ATCC	RPMI
H209	Kleinzeller	ATCC	RPMI
D-51	Adenokarzinom	Charité	L15
D-54	Adenokarzinom	Charité	L15
D-97	Großzelliges Karzinom	Charité	L15
D-117	Adenokarzinom	Charité	L15
BEN	Metastase NSCLC	DSMZ	DMEM+4,5 g Glucose
DMS79	Kleinzeller	ATCC	Waymouth'
H82	Kleinzeller	ATCC	RPMI
CPC-N	Kleinzeller	DSMZ	McCoys
COLO-	Metastase von Kleinzeller	DSMZ	RPMI
COLO-	Kleinzeller	DSMZ	RPMI
COLO-	Adenokarzinom	DSMZ	RPMI
H446	Kleinzeller	ATCC	RPMI
DMS114	Kleinzeller	ATCC	Waymouth'

H1688	Metastase von Kleinzeller	ATCC	RPMI
H187	Kleinzeller	ATCC	RPMI
H378	Kleinzeller	ATCC	RPMI
DV-90	Adenokarzinom	DSMZ	RPMI
SHP77	Großzelliges Karzinom	ATCC	RPMI
A427	Nichtkleinzeller	ATCC	RPMI
N417	Kleinzeller	ATCC	RPMI

2.4 Tumormaterial

Die Arbeiten basieren auf insgesamt drei Tumorkollektiven. Zum einen wurden Proben von Autopsien, die an der Pathologie der Charité, dem Pathologischen Institut der Christians-Albrecht-Universität Kiel und dem Department für Pathologie der Universität Zürich durchgeführt wurden, untersucht. Tumor- und Normalgewebeproben wurden in der Regel tiefgefroren. Dieses Kollektiv wurde insbesondere für die Analyse der hämatogenen Metastasierung von Lungenkarzinomen mit herangezogen, indem synchrone Primär- und Sekundärtumoren untersucht werden konnten.

Bei den weiteren Kollektiven handelt es sich um Resektate von Patienten mit einem Karzinom der Lunge, die an der Charité von Herrn Prof. Gellert operiert wurden. Das Gewebe vom Primärtumor, etwaigen Metastasen und konstitutionellem Normalgewebe wurde innerhalb von 30 min in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Aufarbeitung asserviert. Aus angelegten Primärkulturen wurden die Zelllinien D51, D54, D97 und D117 etabliert (siehe Abschnitt 2.3).

3 Methoden

3.1 Comparative Genomische Hybridisierung (CGH)

Die CGH ist eine molekularzytogenetische Methode, die der Detektion chromosomaler Imbalanzen v.a. in soliden Tumoren dient.

Sie beruht auf der kompetitiven Hybridisierung von unterschiedlich markierter Tumor- und Normal-DNA auf normale Chromosomenmetaphasen, die aus Blutlymphozyten präpariert werden. Der dabei eingesetzte Überschuß an humaner Cot1-DNA dient der Absättigung hochrepetitiver Sequenzen und somit der Suppression ungewünschter Fluoreszenzsignale, insbesondere im Bereich der Chromosomenzentromeren.

Die Genome binden quantitativ an ihre entsprechenden Bindungsstellen auf den Chromosomen. Im Tumor relativ weniger vorkommende Sequenzen führen zur quantitativ überwiegender Hybridisierung von Normal-DNA in diesem Bereich, das Fluoreszenzsignal des Normalgenoms überwiegt. Im umgekehrten Fall einer DNA-Überrepräsentierung oder Amplifikation bindet entsprechend mehr Tumor-DNA und die Fluoreszenz des Tumorgenoms überwiegt. Durch die Aufnahme unterschiedlicher Bilder am Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten Farbfiltern und einer anschließenden quantitativen Auswertung der Fluoreszenzsignale entlang der Chromosomen, können die DNA-Imbalanzen eines Tumors berechnet werden. Das Ergebnis wird in Form eines Ratio-Profiles dargestellt werden, bei dem Ausschläge nach links einer Deletion und Ausschläge nach rechts einer DNA-Überrepräsentierung entsprechen (siehe Abbildung 4).

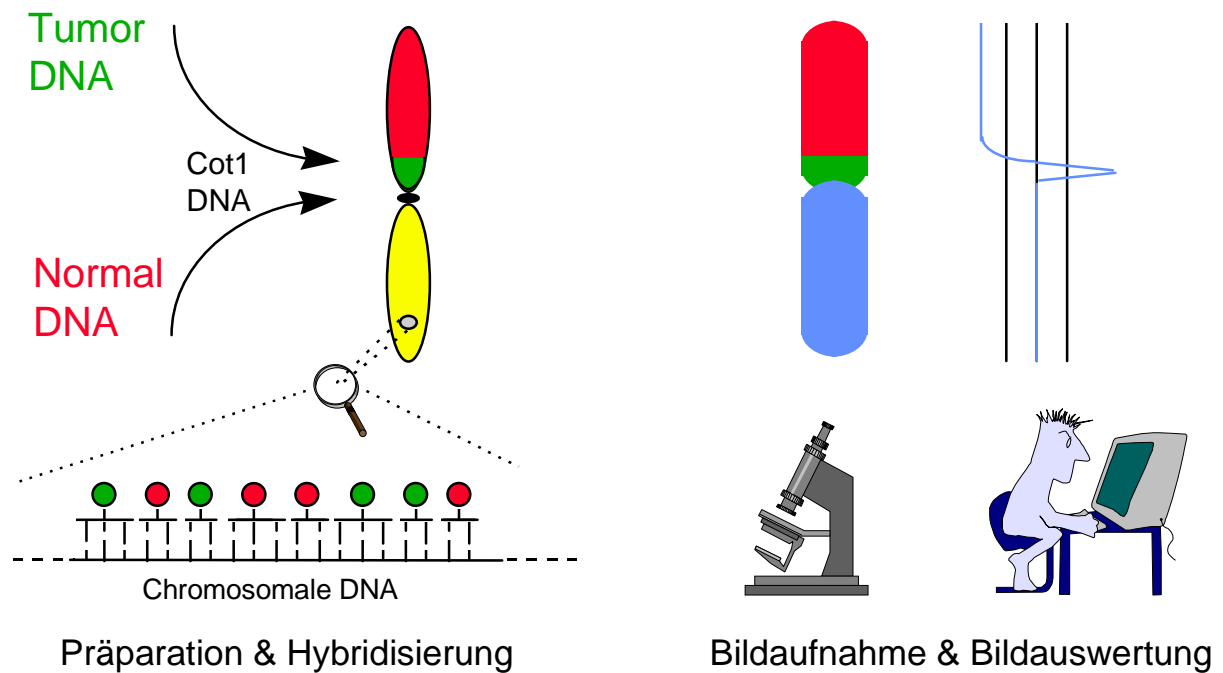


Abb. 4 Die Komparative Genomische Hybridisierung (CGH)

3.1.1 Indirekte Markierung von DNA mittels Nicktranslation

10x NT-Puffer: 0,5 M Tris pH 8,0

50 mM $MgCl_2$

0,5 mg/ml BSA

dNTP's: dATP, dCTP, dGTP je 0,5 mM

dTTP 0,1 mM

Während der Nicktranslation werden durch die DNase Einzelstrangbrüche („Nicks“) in der DNA erzeugt. Bei der Neusynthese von DNA durch die Kornberg-Polymerase werden an den Fragmentenden Hapten-modifizierte Nukleotide eingebaut. Dabei

wurde insbesondere Biotin-16-dUTP im Falle der Markierung von Tumor-DNA und Digoxigenin-11-dUTP im Falle der Normal-DNA aus Blutlymphozyten eingesetzt.

Zur Markierung wurden jeweils 5 µg DNA in einem Endvolumen von 31 µl gelöst und 5 µl NT-Puffer, 5 µl β-Mercaptoethanol (0,1 M), 5 µl dNTP's, 2 µl Biotin-16-dUTP bzw. Digoxigenin-11-dUTP (beides Boehringer Mannheim), 1 µl DNase (3 mg/ml, 1:2000 verdünnt) und 1 µl Kornberg-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) dazupipettiert. Die Reaktion erfolgte für 30 bis 40 min bei 14-16°C im Wasserbad.

Zur Überprüfung der Fragmentlängen wurden 5 µl-Aliquots der Proben auf 1,5%-ige Agarosegele aufgetragen. Die optimale Fragmentlänge sollte zwischen 200-500 bp liegen. Gegebenenfalls wurde die Inkubation nach Zugabe von frischem Enzym verlängert und erneut getestet. Die Reaktion wurde mit 2 µl EDTA (0,5 M) und 2 µl SDS (20%) gestoppt. Die Proben wurden bis zur Hybridisierung bei –20°C gelagert.

3.1.2 Hybridisierung

Mastermix: 20% Dextransulfat/4x SSC

Denaturierungslösung für Objektträger:

49 ml Formamid

7 ml 20x SSC (pH 5,3)

16 ml H₂O bidest.

pH 7,0

Zur Hybridisierung wurden 10 µl Tumor-DNA, 10 µl Normal-DNA, 30 µl humane Cot1-DNA (1 mg/ml, Gibco) sowie 1 µl Heringssperm-DNA (10 mg/ml, Promega) mit 5,1 µl 3 M Natriumacetat und 150 µl absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C oder für 30 Minuten bei -80°C gefällt. Die DNA wurde daraufhin bei 14000 rpm bei 4°C für 30 min zentrifugiert, dekantiert, mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, dekantiert und luftgetrocknet. Danach wurde das Pellet in 5 µl Formamid resuspendiert und bei 37°C für 10 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Mastermix wurde die DNA für 5 Minuten bei 77°C denaturiert und anschließend zur Vorhybridisierung 2-3 h bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt diente der Bindung von Cot 1-DNA an repetitive DNA-Sequenzen innerhalb der Genome.

In der Zwischenzeit wurden die Objektträger denaturiert. Zur Hybridisierung auf normale Chromosomen-Metaphasen wurden vornehmlich kommerziell erwerbliche Objektträger der Firma Vysis eingesetzt. Diese wurden für 5 Minuten in einer Küvette mit auf 70°C vorgewärmter Denaturierungslösung denaturiert und daraufhin in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 90%, 100% eiskalter Ethanol) dehydriert und luftgetrocknet.

Auf diese Objektträger wurden die Proben aufgetragen, mit 16x16 mm² großen Deckgläsern abgedeckt und mit Flüssigklebstoff abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte für 3 Tage in einer feuchten Kammer bei 37°C im Wasserbad.

3.1.3 Detektion

Bei diesem Schritt erfolgt der Nachweis der hybridisierten DNA durch die Kopplung von sekundären Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern an Digoxigenin bzw. Biotin. Dazu wurden die Deckgläschen entfernt und die Objektträger zunächst mehrfach

gewaschen: dreimal 2 min in Formamid/2x SSC bei 37°C, dreimal 2 min in 0,1x SSC bei 60°C und einmal 5 min in 4x SSC/0,1x Tween 20 bei 37°C. Zum Abblocken unspezifischer Bindungen wurden anschließend pro Objektträger 125 µl 3%-iges BSA in 4x SSC/0,1x Tween 20 aufgetragen und bei 37°C in der feuchten Kammer für 20 min inkubiert. Nach einem weiteren Schritt in 4x SSC/0,1x Tween 20 bei 37°C erfolgte der eigentliche Detektionsschritt mit je 125 µl 3%-iger BSA-Lösung, der im Verhältnis 1:100 Anti-Dig-Rhodamin (TRITC, Boehringer Mannheim) und 1:125 Fluoreszein-Avidin (FITC, Vector Laboratories) zugegeben worden sind. Die Inkubation wurde in der feuchten Kammer bei Dunkelheit für 30 min im 37°C-Wasserbad durchgeführt. Anschließend wurden die Objektträger noch dreimal je 3 min in 4x SSC/0,1x Tween 20 bei 45°C gewaschen und für 5 min in DAPI-Lösung (40 ng/ml) gefärbt. Nach einem kurzen Spülen in Aqua bidest. wurden die Objektträger in 35 µl DABCO eingebettet.

Zur Verzögerung des Ausbleichens der Fluorochrome wurden die letzten Schritte unter Vermeidung direkter Belichtung durchgeführt und die Präparate in einer Mappe bei 4°C aufbewahrt.

3.1.4 Bildaufnahme

Pro Fall wurden ca. 15 Metaphasen unter Verwendung eines Zeiss-Axiophot-Fluoreszenzmikroskopes aufgenommen. Dabei wurden entsprechend angefertigte einzelne Filter für FITC (Zeiss-Filterset 10, Anregung: BP 450-490, Emission: BP 515-565), TRITC (Chroma-Filterset HQ Cy3+Exzitationsfilter vom Zeiss-Filterset 15, Anregung: BP 546/12, Emission: BP 570-650) sowie DAPI (Zeiss-Filterset 02, Anregung: G365, Emission: LP 420) verwendet.

Für die Digitalisierung der Fluoreszenzbilder wurde eine CCD-Kamera (Photometrics, Tucson, Arizona) verbunden mit einem Macintosh Quadra 950 (Apple, Cupertino, Kalifornien) mit dem Softwareprogramm Nu200 2.0 benutzt. Die Belichtung erfolgte mit einer 100 W Quecksilberlampe. Die Belichtungszeiten hingen von der Intensität der Fluoreszenzsignale ab und lagen für FITC zwischen 2 und 6 s, für TRITC zwischen 1 und 5 s und für DAPI zwischen 0,1 und 0,3 s. Die von der CCD-Kamera aufgenommenen Fluoreszenzbilder wurden als Dateien im 8 bit-TIFF-Format (256 Graustufen) gespeichert.

3.1.5 Statistische Auswertung

Die so gewonnenen Metaphasen-Bilder wurden in mehreren Schritten mit einem in der Arbeitsgruppe erstellten CGH-Programm zu Karyogrammen sortiert. Dabei erfolgte zunächst die Übereinanderlegung der einzelnen Bilder und die Berechnung eines Ratio-Bildes aus dem FITC- und TRITC-Bild, wobei die Veränderungen in Falschfarben dargestellt werden. In weiteren Schritten wurden die Metaphasen zerschnitten, karyotypisiert und alle Metaphasen eines Falles übereinandergelegt. Die Veränderungen eines Falles sind als Summenkaryogramm darstellbar und verschlüsseln DNA-Überrepräsentationen (grün), DNA-Verluste (rot) bzw. die Äquivalenz zwischen Tumor- und Normal-Genom (blau). Auf die Details des Programmes kann in diesem Rahmen nicht eingegangen werden. Die in diesem CGH-Programm verwendeten Algorithmen sind publiziert (Roth et al, 1997).

Bei der Analyse größerer Fallzahlen ist die Zusammenfassung von einzelnen Entitäten bzw. Subgruppen möglich. Dabei werden die entsprechenden Fälle einer Tumorgruppe entweder als sogenannte Superkaryogramme oder als Histogramme zusammengefaßt. Das ermöglicht einen Hinweis auf chromosomale Veränderungen

und deren Inzidenz in der entsprechenden Entität, macht aber andererseits auch einen statistischen Vergleich zweier Subgruppen möglich. Die Details bzw. deren Anwendung ist den beigefügten Arbeiten (Bockmühl et al, "Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and non-metastasizing primary head and neck carcinomas" sowie Petersen et al, "Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung") zu entnehmen.

3.2 Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung von PAC-Klonen

Die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung von PAC-Klonen dient zum einen der chromosomalen Lokalisation von Genen, kann aber auch bei der Hybridisierung auf Tumor-Metaphasen Hinweise auf chromosomale Rearrangements liefern. Die Hybridisierung ähnelt prinzipiell den o.a. Protokollen für die CGH. Die PAC-Klone wurden ebenfalls mittels Nicktranslation markiert und auf Metaphasen-Chromosomen hybridisiert (ohne Einsatz von Normal-DNA und Cot1-DNA). Die wie unter 3.2.1 präparierten Tumor-Metaphasen wurden nach dem Auftropfen mindestens eine Woche getrocknet und in der entsprechenden Denaturierungslösung für 2 bis 2,5 min denaturiert. Die Proben wurden ohne längere Vorhybridisierungszeit aufgetragen.

Die Detektion erfolgte mit dem entsprechenden Fluorochrom wie unter 3.1.3 angegeben.

3.2.1 Metaphasenpräparation von Tumorzellen

Hypotone Lösung: 0,8% Natriumcitrat

Fixativ: 75% Methanol
 25% Essigsäure

Die Präparation von Tumormetaphasen erfolgte von 60-70% konfluenten Zellen. Diese wurden über Nacht mit 10-20 µl Colcemid (10 µg/ml) auf 15 ml Medium behandelt. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit 1x PBS gespült und mit 1,5 ml frischem Trypsin-EDTA für 5 min bei 37°C inkubiert bis alle Zellen abgelöst waren. Das Trypsin wurde durch Zugabe von Medium gestoppt. Nach dem Mixen mit der Pipette wurde die homogene Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen transferiert und für 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Hanks-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert.

Der Überstand wurde entfernt und tropfenweise 5 ml frisch angesetzte, vorgewärmte (37°C) hypotone Lösung zugegeben. Dabei muß eine Verklumpung des Zellpellets unbedingt vermieden werden. Die Zellen wurden für 20 min im 37°C-Wasserbad inkubiert und anschließend 8 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet durch Schnipsen am unteren Rand des Röhrchens aufgelockert, und in 5 ml Fixativ resuspendiert. Dieser Fixationsschritt wurde nach der Zentrifugation fünf- bis sechsmal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 0.5 bis 1 ml Fixativ resuspendiert. Davon wurden 3 bis 4 Tropfen auf einen kalten, feuchten Objektträger aufgetropft und im Phasenkontrastmikroskop untersucht. Danach wurde die optimale Verdünnung ermittelt und die Metaphasen so aufgetropft, daß die Metaphasen gut gespreizt waren.

3.3 Isolation von genomischer DNA

Digestionspuffer: 50 mM Tris (pH 8,5)

1 mM EDTA

0,5% Tween 20

Zur Präparation von genomischer DNA aus Zelllinien wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und trypsinisiert. Das Trypsin wurde durch Zugabe von Medium inaktiviert und die Zellen anschließend im Zellkultur-Röhrchen bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 800 µl Digestions-Puffer aufgenommen und mit 40 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt. Der Verdau erfolgte für 48 h bei 50°C.

Von den tiefgefrorenen Tumorproben wurden am Gefriermikrotom 20-30 Schnitte (Schnittdicke 30 µm) angefertigt und in 2 ml-Eppendorfgefäße mit je 800 µl Digestionspuffer überführt. Der erste und letzte Schnitt des jeweiligen Blockes wurde auf Objektträger aufgezogen, und zur histologischen Beurteilung mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Der Verdau erfolgte daraufhin über Nacht bei 50°C mit 20-30 µl Proteinase K (20 mg/ml). Zur DNA-Extraktion wurde das Lysat mit dem gleichen Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohl 25:24:1 (pH 8,0) ausgeschüttelt und bei RT für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohl ausgeschüttelt. Nach der Zentrifugation wurde die wäßrige Phase abpipettiert und zum Entfernen von Phenol-Resten mit dem gleichen Volumen Chloroform:Isoamylalkohl 24:1 versetzt und wie oben beschrieben zentrifugiert.

Anschließend wurde die obere Phase mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 1 Volumen Isopropanol gefällt.

Die Präzipitation erfolgte durch Zentrifugation bei 14000 rpm bei 4°C für 30 min. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und bei 14000 rpm, 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das luftgetrocknete DNA-Pellet in 50-100 µl H₂O gelöst.

3.4 Restriktionsverdau

Zum Verdau von genomischer DNA für Southern Blot-Analysen wurden 10 µg DNA mit 60 U Restriktionsendonuclease (Boehringer Mannheim) in Anwesenheit des empfohlenen Puffers bei 37°C über Nacht inkubiert.

Für die Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA wurden 0,5-2 µg aufgereinigtes Plasmid mit einer Einheit Restriktionsenzym pro µg DNA verdaut. Die Inkubation erfolgte für 1-3 h bei 37°C.

3.5 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarosegelen in 0,5x TBE, wobei die Konzentration der Gele in Abhängigkeit von der Fragmentlänge variiert wurde. Für Southern Blot-Analysen wurde die restringierte genomische DNA in 0,7%-igen Agarosegelen bei 60 V für 3-4 h aufgetrennt.

Die elektrophoretische Auftrennung von Plasmid-DNA erfolgte in 1%-igen und die von PCR-Fragmenten in 1,5%-igen Agarosegelen bei 100 V.

3.6 Southern Blotting

Bei dieser Technik werden elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf Nitrozellulose transferiert. Dazu wurden die Gele nach der Dokumentation zunächst in 0,25 M Salzsäure für 30 min depuriniert. Anschließend wurden sie 2x 15 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl/0,5 M NaOH) gewaschen und in zwei weiteren 15-minütigen Waschschritten in 3 M NaCl/1 M Tris (pH 7,0) neutralisiert. Der Transfer der DNA erfolgte über Vakuumblotting bei 5 mm Hg für 90 min in 10x SSC. Dazu wurden die Gele kurz in 10x SSC gewaschen und die Nitrozellulose-Membran (Amersham) in 2x SSC getränkt. Auf angefeuchtetes Whatmanpapier und die darauf befindliche Membran wurde die Maske gelegt, um einen luftdichten Abschluß der Blot-Apparatur zu gewährleisten. Anschließend wurde das Agarosegel aufgelegt und das Vakuum angeschlossen. Nach dem Abbau der Apparatur wurde die Membran 5 min in 2x SSC gewaschen, luftgetrocknet und 3 min unter UV-Licht quervernetzt.

3.7 Allelotypisierung

Die LOH-Analyse (loss of heterozygosity) basiert auf der Untersuchung von polymorphen genetischen Markern innerhalb des Genoms. Es werden heutzutage vor allem sogenannte Mikrosatelliten-Polymorphismen eingesetzt, bei dem sich die Allele durch die Anzahl kurzer repetitiver Sequenzen unterscheiden. Insbesondere wenn sich das paternale und maternale Allel in der Fragmentlänge unterscheiden (Heterozygotie), kann durch den Vergleich beider Allele in Tumor- und Normal DNA eines Individuums eine Deletion als Heterozygotie-Verlust (LOH) festgestellt werden. Der Nachweis von Allelverlusten kann damit zur Lokalisation von Tumorsuppressorgenen („deletion mapping“) benutzt werden.

Die genauen präparativen Schritte sowie die Auswertung sind in den beigefügten Arbeiten (Petersen et al, „Allelic loss on chromosome 10q in human lung cancer: association with tumor progression and metastatic phenotype“ und „Distinct regions of allelic imbalance on chromosome 10q22-q26 in squamous cell carcinomas of the lung“) aufgeführt.

3.8 SSCP-Analyse

Die Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (Single Strand Conformation Polymorphism Analysis, SSCP) dient der Detektion von DNA-Mutationen auf Nukleotid-Ebene. Dabei werden mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente denaturiert und auf einem hochauflösenden Polyacrylamid-Gel unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt.

150 ml SSCP-Gel:	37,5 ml MDE-Hydrolink-Lösung (Biozym)
	9,0 ml 10x TBE
	112,5 ml Aqua bidest.
	600 µl 10% APS
	60 µl TEMED

Zur Mutationsanalyse des DMBT1-Genes wurden PCR-Fragmente von Tumor- und Normalgewebs-Proben, die Chromosom 10q-Allelimbalancen aufwiesen amplifiziert. Dazu wurden zu je 100 ng DNA bzw. cDNA je 15 pmol der Primer dmbt1-8f 5'-GTCCTACCTGTGGAGCTG-3' und dmbt1-8r 5'-GACCAACCTCAAGGTGGCAT-3'

und 200 µmol dNTP's sowie Taq-Polymerase im entsprechenden Puffer pipettiert. Die Proben wurden denaturiert für 2 min bei 98°C und dann in 35 Zyklen amplifiziert (30 s bei 95°C, 15 s bei 58°C und 1 min bei 72°C) gefolgt von einem 10-minütigen Auffüllschritt bei 72°C. Ein 950 bp-langes cDNA-Fragment sowie die genomischen Fragmente der STS 60k, g14, g14ext, 101n, 36k und 74k wurden amplifiziert wie publiziert (Mollenhauer et al, 1997).

Für die Einzelstrang-Polymorphismus-Analyse wurden 0,8 mm dicke Polyacrylamidgele eingesetzt, die mindestens 3 h polymerisiert waren.

10 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl 1% SDS/10 mM EDTA und 2 µl Stopplösung (aus Sequenzier-Kit) versetzt, 15 min bei 98°C denaturiert und sofort für mindestens 10 weitere Minuten auf Eis gestellt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte über Nacht bei 8 Watt in 1x TBE.

Nach dem Lauf erfolgte zur Sichtbarmachung der PCR-Fragmente die Silberfärbung nach Budowle. Dazu wurde das Gel 10-15 min in 1%-iger Salpetersäure fixiert, kurz in Aqua bidest. gespült, 20-25 min in 0,2%-iger Silbernitratlösung gefärbt und 5-10 min in Aqua bidest. gewaschen. Die Entwicklung erfolgte in 0,28 M Natriumcarbonatlösung, der erst unmittelbar vor Gebrauch 37%-ige Formaldehydlösung (1,5 ml auf 3 l) hinzugefügt worden ist. Nach dem Erscheinen der Banden, wurde das Gel kurz in Wasser gespült und anschließend in 10%-iger Essigsäure fixiert. Nach kurzem Waschen in H₂O wurde das Gel auf Filterpapier aufgezogen und ca. 1-1,5 h bei 80°C auf dem Gelrockner getrocknet.

3.9 Direkte Sequenzierung von PCR-Produkten

Diese Technik wurde insbesondere zur Mutationsanalyse des PTEN/MMAC1-Genes eingesetzt. Dazu wurden alle 9 Exons amplifiziert. Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte radioaktiv. Detaillierte Protokolle sind in der beigefügten Originalarbeit „Distinct regions of allelic imbalance on chromosome 10q22-q26 in squamous cell carcinoma of the lung“ nachzulesen.

3.10 RNA-Präparation aus Zellen

Lysis-Puffer: 100 g Guanidinothiocyanat

 1,54 g Natriumcitrat

 1,01 g Sarkosil

 116,8 ml DEPC-Wasser

 autoklavieren

 vor Gebrauch 2% β -Mercaptoethanol hinzufügen

Phenol: pulverisiertes Phenol bei 50°C schmelzen

 zweimal mit 1 Volumen sterilem Aqua dest. ausschütteln

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde nach dem Entfernen des Mediums mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von 4 ml Lysis-Puffer pro T175-Zellkulturflasche (Falcon) wurde das Lysat in Zellkulturröhrchen (Sarstedt) überführt. Die Proben sind in diesem Stadium sehr stabil und wurden gegebenenfalls bei -80°C aufbewahrt.

Die Lysate wurden mit 1/10 Volumen 2 M Natriumacetat (pH 4,0) angesäuert, gemixt, mit 1 Volumen Phenol versetzt, wieder gemischt und nach Zugabe von 2/10 Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) und erneutem Mixen 5-7 min auf Eis inkubiert bis ein milchiger Niederschlag erscheint. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 9000 rpm bei 15°C, wurde der Überstand vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt und 30 min bei -20°C mit 1 Volumen Isopropanol gefällt.

Die Proben wurden anschließend bei 11000 rpm für 20 min bei 4°C pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes und einem Waschschrift mit 3 ml 80%-igem Ethanol und erneuter Zentrifugation bei 11000 rpm für 5 min bei 4°C, wurde der Überstand erneut entfernt.

Das luftgetrocknete Pellet wurde in 500 µl Lysis-Puffer gelöst und mit 1 Volumen Isopropanol für 1 h bei -20°C gefällt. Nach Präzipitation der RNA bei 14000 rpm für 20 min bei 4°C, und einem erneuten Waschschrift mit 80%-igem Ethanol wurde das luftgetrocknete RNA-Pellet in 50-100 µl DEPC- H₂O gelöst und bei -80°C aufbewahrt.

3.11 RNA-Präparation aus Gewebe mittels QIAGEN-RNeasy Mini Kit

Um RNA aus Gewebe zu isolieren, wurden zunächst jeweils 60 Cryostat-Schnitte in Eppendorf-Röhrchen überführt, in die bereits 600 µl Lysispuffer vorpipettiert wurden.

Um das Gewebe vollständig aufzuschließen, wurde das Lysat über QIAshredder 3 min kalt bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde mit 1 Volumen 70%-igem Ethanol mittels Pipette gut gemischt und auf RNeasy-Säulen aufgetragen. Nach kurzer Zentrifugation bei 10000 rpm wurden die Säulen zunächst mit 700 µl RW1-Puffer versetzt, bei 10000 rpm für eine Minute zentrifugiert und noch zweimal mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen.

Die Elution der RNA in ein neues Röhrchen erfolgte mittels 30 µl RNase-freiem Wasser über einen 2-minütigen Zentrifugationsschritt (10000 rpm).

Um die Kontamination mit DNA zu beseitigen, wurden die eluierten Proben mit 2 µl RQ-RNase freier DNase (Promega) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert.

Um die DNase anschließend zu inaktivieren bzw. zu entfernen, wurden die Proben mit 70 µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt, mit 350 µl RLT-Puffer sowie 250 µl absolutem Ethanol gemischt, auf die Säulen aufgetragen und bei 10000rpm 15 s zentrifugiert. Nach zwei Waschschritten mit 500 µl RPE-Puffer wurden die Säulen in neue Röhrchen überführt und mit 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

3.12 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

10x MEN:	200 mM MOPS
	50 mM Natriumacetat
	10 mM EDTA
	pH 7,0

RNA-Laufpuffer:	500 µl Formamid
	2 µl EDTA (1 M)
	5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)
	0,1% Bromphenolblau

Gesamt-RNA wurde in 1%-igen denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt. Diese

enthielten 6% Formaldehyd und 1x MEN. 10 µg RNA wurden vor dem Auftragen mit dem gleichen Volumen RNA-Laufpuffer gemischt, 10 min bei 56°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte bei 60 V in 1x MEN-Puffer.

3.13 Northern Blotting

Das unter dem UV-Transilluminator fotografierte Gel wurde zum Transfer der RNA auf Nitrozellulose-Membranen (Amersham) zweimal 20 min in Aqua bidest. gespült, um das Formaldehyd zu entfernen. Der eigentliche Transfer erfolgte mittels Kapillarblotting. Dazu wurde in 10x SSC-getränktes Whatman-Papier so auf eine Glasplatte gelegt, daß die Ränder überstehen und in eine mit 10x SSC gefüllte Schale reichen. Darauf wurde umgekehrt (Taschen nach unten) das RNA-Gel gelegt. Auf dieses wurde luftblasenfrei eine in 2x SSC-befeuchtete Nitrozellulose-Membran und darüber zwei ebenfalls angefeuchtete und vier trockene Whatman-Papiere gelegt. Diese wurden mit einem Stapel saugfähigem Papier überschichtet und beschwert. Der Transfer erfolgte für mindestens 12 h.

Anschließend wurde die Membran 5 min in 2x SSC gewaschen, luftgetrocknet und 3 min im UV-Crosslinker fixiert.

3.14 Radioaktive Markierung von Sonden

Als Sonden für die radioaktive Hybridisierung wurden PCR-Produkte eingesetzt. Diese wurden über den PCR purification Kit (QIAGEN) nach Bedienungsanleitung aufgereinigt und quantitativ auf dem Agarose-Gel abgeschätzt.

Die Markierung erfolgte mittels Multiprime Labelling Kit (Amersham). Dazu wurden 25 ng aufgereinigtes PCR-Produkt in einem Endvolumen von 28 µl verdünnt und bei

95°C für 5 min denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 10 µl Puffer, 5 µl Primer, 2 µl Klenow-Polymerase und 4 µl $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP erfolgte die Markierung für mindestens 4 h bei 37°C.

Die Sonden wurden über Sephadex Säulen aufgereinigt (Pharmacia) und vor der Zugabe zur Hybridisierungslösung 5 min bei 99°C denaturiert.

3.15 Radioaktive Hybridisierung von Northern- und Southern-Blots

Die radioaktive Hybridisierung von Northern- und Southern-Blots erfolgte prinzipiell gleich. Als Hybridisierungslösung wurde kommerziell erwerbliche ExpressHyb-Lösung (CLONTECH) benutzt. Die Blots wurden bei 58°C zunächst für mindestens 30 min prähybridisiert. Anschließend wurde die denaturierte Sonde hinzupipettiert und über Nacht bei derselben Temperatur hybridisiert.

Am nächsten Tag wurden die Blots zunächst zweimal 15 min bei RT in 2x SSPE/0,1% SDS gewaschen. Zwischendurch erfolgte die Messung der Blots, um die Effizienz der Waschschrte zu beobachten und ein Abwaschen der Sonde zu vermeiden. Gegebenenfalls wurden weitere stringente Waschschrte durchgeführt: 15 min bei 60°C in 1x SSPE/0,1% SDS und 10 min bei 60°C in 0,1x SSPE/0,1% SDS.

Die Blots wurden eingeschweißt und auf BioMax-MR Filmen (Kodak) bei -80°C exponiert.

3.16 cDNA-Synthese

Bei der reversen Transkription von RNA in cDNA wurden jeweils 3 µg Gesamt-RNA

umgeschrieben. Dazu wurde die RNA mit 2 µl Hexamer-Random-Primer (Promega) in einem Endvolumen von 10 µl 10 min bei 65°C denaturiert. Um die Bindung der Primer an die RNA zu ermöglichen, wurden die Proben danach kurz auf Eis inkubiert. Dazu wurden 4 µl 5x first strand buffer RT (Gibco), 2 µl 0,1 M DTT (Gibco), 2 µl 5 mM dNTP's, 0,5 µl RNase Inhibitor (40 U/µl, Promega) sowie 1 µl Superscript II- Reverse Transkriptase (200 U/µl, Gibco) pipettiert. Die Reaktion erfolgte 1 h bei 42°C im Thermocycler und wurde anschließend durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C gestoppt.

Die cDNA-Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

3.17 Klonierung von PCR-Fragmenten

Um unbekannte PCR-Fragmente zu klonieren wurde das Verfahren der TA-Klonierung eingesetzt. Dabei wird die Erzeugung eines polyA-Schwanzes bei der PCR durch die Taq-Polymerase genutzt, welche in einen Vektor mit polyT-Enden einkloniert werden können.

LB-Platte:	10 ml LB-Agar
	10 µl Ampicillin (50 mg/ml)
	16 µl X-Gal (40 mg/ml)
	2,5 µl IPTG (2 M)

Die zu klonierenden PCR-Fragmente wurden über QIAGEN-Säulen (PCR Purification Kit) aufgereinigt, wie in der Kit-Vorschrift angegeben. Die Elution erfolgte mit 60 µl

Tris-HCl (1 mM). Davon wurden 10 µl zur quantitativen Abschätzung auf einem Agarosegel aufgetragen. Sechs bis 10 ng wurden mit 50 ng pCR 2.1 Vektor mit 4 U T4 DNA-Ligase in Anwesenheit von 1x Ligationspuffer über Nacht bei 16°C ligiert (TA-Cloning Kit, Invitrogen).

Zur Transformation wurden kompetente E. Coli-Zellen (Invitrogen) auf Eis aufgetaut, mit 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol gemischt und der gesamte Ligationsansatz dazupipettiert und 30 min auf Eis gehalten. Danach wurde diese Mischung für exakt 30 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µl 37°C-warmem SOC-Medium wurden die Bakterien eine Stunde im 37°C-Inkubator geschüttelt. Die Bakterien wurden dann in 2 Portionen zu 50 µl und 250 µl ausplattiert und über Nacht bei 37°C über Nacht inkubiert. Die weißen Kolonien, welche durch Einbau des Inserts in das lacZ-Operon die Fähigkeit zur Farbentwicklung verloren hatten, wurden gepickt und für die Plasmidpräparation angezüchtet.

3.18 Plasmidpräparation

P1-Puffer: 15 mM Tris, pH 8,0

 10 mM EDTA

 vor Gebrauch 100 µg/ml RNase A hinzufügen,
 sterilfiltrieren

P2-Puffer: 0,2 N NaOH

 1% SDS

 autoklavieren, bei 4°C aufbewahren

P3 Puffer: 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Zur Isolation von Plasmiden bzw. PAC's wurden Übernachtskulturen im entsprechenden Medium (LB bzw. YT-Broth) mit Antibiotikazusatz angeimpft. Am nächsten Tag wurden diese bei 3500 rpm für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 300 µl P1-Puffer resuspendiert und für 5 min mit 300 µl P2-Puffer lysiert. Daraufhin wurden die Proteine und die chromosomale DNA mit 300 µl P3-Puffer präzipitiert. Nach Inkubation auf Eis für 5 min wurden die Proben 10 min bei 14000 rpm bei 4°C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden QIAGEN-Säulen mit dem entsprechenden Puffer equilibriert und anschließend der Überstand der Proben auf die Säulen aufgetragen. Nach vierfachem Waschen mit je 1 ml QC-Puffer, wurde die Plasmid-DNA mit 800 µl QF-Puffer eluiert und mit 560 µl Isopropanol umgefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm bei 4°C wurde das Pellet mit 70%-igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 11 µl Aqua bidest. resuspendiert.

Für die Maxi-Präparation wurden das Volumen der Puffer entsprechend erhöht.

3.19 Automatische Sequenzierung

6% Sequenziergel: 30 ml Sequagel XR (Biozym)

 7,5 ml Sequagel-Puffer (Biozym)

 400 µl DMSO

 300 µl APS

Sequenzierprimer:

M13-forward: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'

T7-Promotor: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

Die Sequenzierung erfolgte mittels Thermosequenase fluorescent labelled Cycle-Sequencing-Kit (Amersham). Die Sequenzierreaktionen wurden nach dem folgenden Schema pipettiert:

1 µl H₂O

1 µl Plasmid-DNA (100-400 ng/µl)

1 µl Nucleotid-Mix

1 µl Primer (2pmol/µl)

und mit Wachs überschichtet. Nach 5-minütiger Denaturierung bei 95°C folgten 30 Zyklen mit 30 s bei 95°C, 15 s bei 50°C und 60 s bei 70°C. Die Reaktionen wurden anschließend mit 4 µl Stopplösung beendet. Nach 5-minütigem Denaturieren bei 70°C wurde je 1µl der Proben auf die Sequenziergele geladen. Die Auftrennung erfolgte auf einem LiCOR-Sequenziergerät (MWG).

3.20 PolyA-RNA-Isolierung

Die Aufreinigung von mRNA aus Gesamt-RNA für die Erstellung von Expressionsbibliotheken wurde von 1-1,5 mg RNA mittels mRNA-Separator-Kit (CLONTECH) durchgeführt. Dazu wurde die RNA auf eine Konzentration von 1 mg/ml in DEPC-Wasser eingestellt und für 8 min bei 80°C denaturiert. In der Zwischenzeit wurden die Oligo-dT-Zellulose-Säulen wie in der Anleitung angegeben vorbereitet.

Nach der Denaturierung wurde die RNA für 5-8 min bei RT stehengelassen und unmittelbar vor der Beladung der Säule mit 1/5 Volumen Sample-Puffer versetzt. Unter intensivem Auf- und Abpipettieren wurde diese Suspension mit den Oligo-dT-Partikeln der Säule gemischt und für 10 min bei RT belassen, um die Bindung der PolyA-RNA an die Oligo-dT-Partikel zu gewährleisten. Anschließend wurde die Säule in einem Zellkulturröhrchen für 2 min bei 1500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Dann wurde die Säule dreimal mit je 300 µl High-Salt-Puffer und dreimal mit je 600 µl Low-Salt-Puffer gewaschen. Zwischendurch erfolgte die Zentrifugation bei 1500 rpm für 2 bzw. 3 min bei 4°C.

Die Elution erfolgte dreimal mit je 400 µl auf 65°C vorgewärmtem Elutions-Puffer unter Zentrifugation bei 1500 rpm für 2 min bei RT in Eppendorfgefäße.

Die Ausbeute und die Reinheit wurden spektrophotometrisch bestimmt unter Messung der Absorption bei 260 nm und dem Quotienten aus 260nm/280nm.

Gegebenenfalls wurde die Reinigung wiederholt. Der Prozentsatz von polyA-RNA sollte zwischen 2 und 3% der eingesetzten Menge liegen. Die Ratio sollte 1,8 bis 2,0 betragen.

Abschließend wurde die polyA-RNA mit 1/10 Volumen 2 M Kaliumacetat und 2,5

Volumen absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt und am nächsten Tag präzipitiert. Die polyA-RNA wurde in einer Konzentration von $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in RNase-freiem Wasser gelöst.

3.21 Erstellung von Expressionsbibliotheken

Prinzip

Bei der PCR select (CLONTECH) werden differentielle cDNA-Fragmente selektiv amplifiziert, wohingegen unspezifischer Hintergrund unterdrückt wird (Diatchenko et al, 1996). In der Abbildung 5 sind die detaillierten Schritte der PCR select-cDNA-Subtraktion dargestellt. Zunächst werden beide cDNA-Populationen mit dem Restriktionsenzym RsaI, einem Enzym mit einer vier-Basen-Erkennungsregion, welches glatte Schnittstellen erzeugt, restringiert. Die tester-cDNA wird dann in zwei Subpopulationen geteilt, an die ein jeweils unterschiedlicher Adaptor ligiert wird. Dieser ist am Ende dephosphoryliert, so daß nur ein Strang des Adaptors an das 5'-Ende der cDNA-Moleküle ligiert wird. Beide Adaptoren haben unterschiedliche Sequenzen, um die Anlagerung von zwei unterschiedlichen PCR-Primern zu gewährleisten. Die driver-cDNA wird nicht ligiert.

In der nun folgenden ersten Hybridisierung wird ein Überschuß an driver-cDNA zur tester-cDNA hinzugefügt, die Proben werden hitzedenaturiert und über Rehybridisierung entstehen unterschiedliche Produkte a, b, c und d (siehe Abbildung 5). Doppelsträngige Typ a-Moleküle werden angeglichen, da die Wiederausammenlagerung von DNA-Molekülen für Moleküle, die in höherer Anzahl vorliegen, schnell erfolgt (Kinetik zweiter Ordnung). Gleichzeitig werden differentiell exprimierte einzelsträngige Typ a-Moleküle signifikant angereichert.

Beim zweiten Hybridisierungsschritt werden die beiden ersten Hybridisierungsproben ohne weiteren Denaturierungsschritt zusammengefügt. Nun können lediglich übriggebliebene einzelsträngige tester-cDNA-Moleküle reassoziieren und Typ e-Hybrid-Moleküle, doppelsträngige Moleküle mit unterschiedlichen Enden (Adaptorsequenzen 1 und 2), bilden. Frische denaturierte driver-cDNA wird zur weiteren Anreicherung der Fraktion e hinzugefügt.

Anschließend wird eine PCR durchgeführt, um die gewünschten differentiellen Gensequenzen zu amplifizieren. Dabei können Typ a- und d-Moleküle aufgrund der fehlenden Primer-Bindungsstellen nicht amplifiziert werden. Die meisten Typ b-Moleküle formen Sekundärstrukturen, was ebenfalls die exponentielle Amplifikation unterbindet. Da Typ c-Moleküle nur eine Primer-Bindungsstelle besitzen, werden sie linear amplifiziert, Typ e-Moleküle - also differentiell exprimierte Sequenzen hingegen als einzige exponentiell.

In einer zweiten PCR mit nested-Primern wird der Hintergrund reduziert und die differentiellen Genprodukte weiter angereichert. Diese PCR-Produkte können dann direkt in einen TA-Cloning-Vektor ligiert werden.

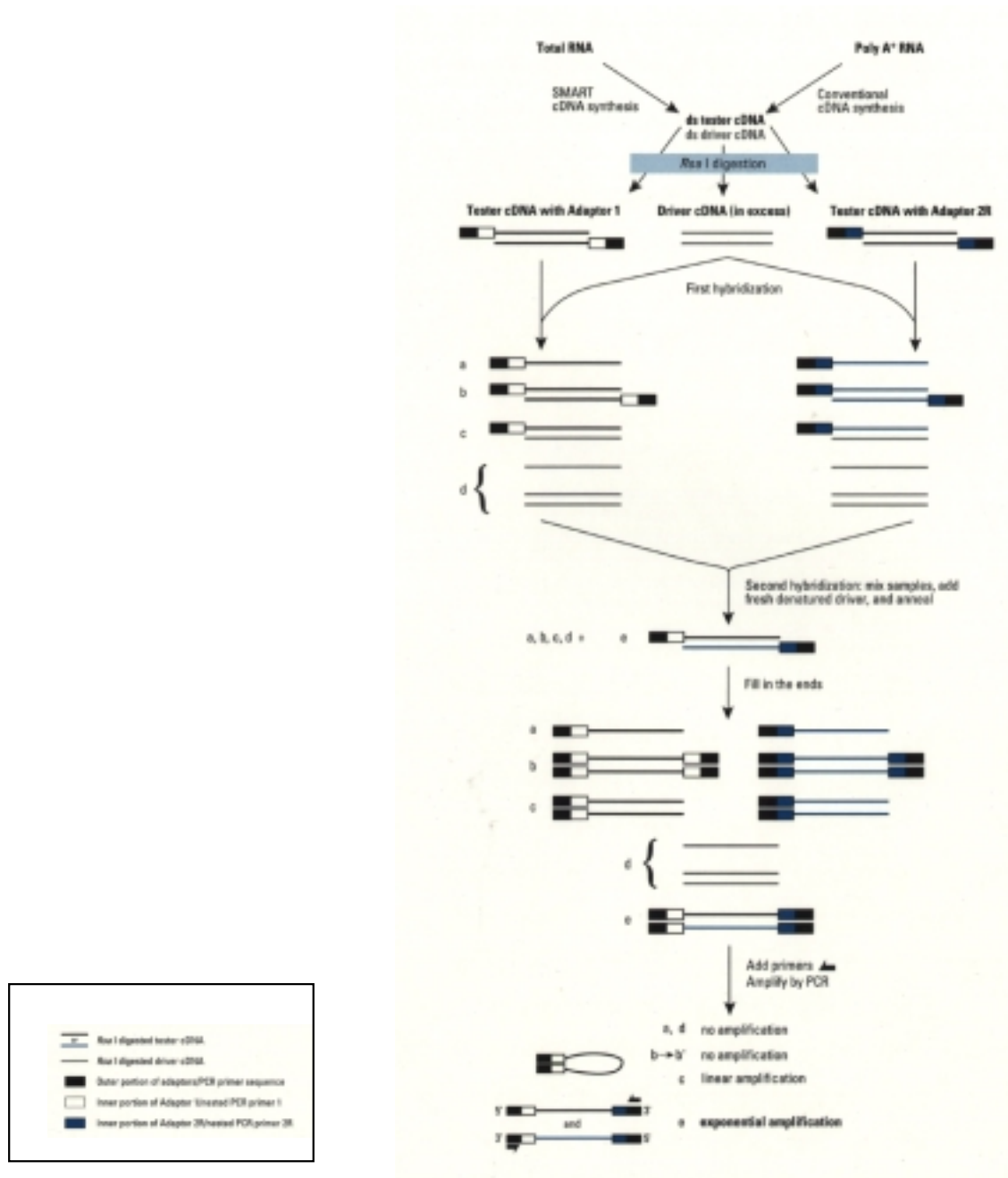


Abb.5 Schema zur Erstellung einer cDNA-Bibliothek mittels PCR-Select (aus PCR select, Kit-Vorschrift, CLONTECH)

Durchführung

Es wurde jeweils eine Expressionsbibliothek von herauf- sowie von herabregulierten Genen kloniert. Der Vergleich erfolgte dabei von einer Bronchialepithel-Primärkultur (SAEC= small airway epithelial cells, CLONETICS) und der selbstetablierten Lungenkarzinom-Zelllinie D51 (metastasiertes Adenokarzinom).

Die einzelnen Schritte wurden wie in der Kit-Anleitung beschrieben durchgeführt und umfaßten:

- Isolation von Gesamt-RNA aus den Zellen
- PolyA-RNA-Isolation
- cDNA-Synthese beider Populationen
- RsaI-Restriktionsverdau
- Adaptorligation
- erste und zweite Hybridisierung
- selektive Anreicherung differentieller cDNA-Fragmente über nested-PCR
- Klonierung der Genbibliotheken
- Plasmidpräparation der Klone
- Sequenzierung
- Northern Blot-Analyse der Fragmente

4 Ergebnisse

4.1 Chromosomale Veränderungen in metastasierten und nicht-metastasierten Plattenepithelkarzinomen der Lunge

Die chromosomalen Veränderungen der 50 Plattenepithelkarzinome sind in der Abbildung 6 als Histogramm zusammengefaßt. Die genetischen Veränderungen sind in Form von Inzidenzkurven entlang der Chromosomenideogramme dargestellt.

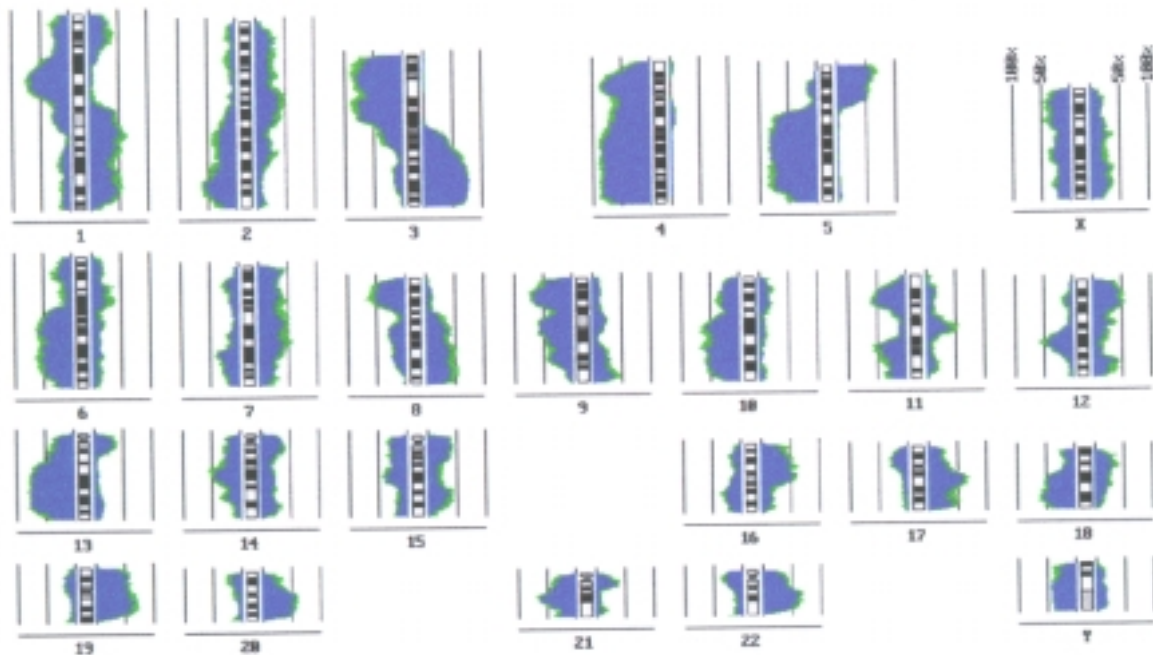


Abb.6 Zusammenfassung der chromosomalen Veränderungen in 50 Plattenepithelkarzinomen der Lunge in Form eines Histogramms. Areale auf der linken Seite entsprechen DNA-Verlusten, die auf der rechten Seite DNA-Überrepräsentationen. Die vertikalen Linien geben die Inzidenz der Veränderungen als prozentualen Anteil der Fälle an, welche diese Veränderungen aufweisen. Alterationen mit 99%-iger Signifikanz sind blau und mit 95%-iger Signifikanz grün dargestellt. Die Zentromer-Regionen der Chromosomen 1, 9 und 16 müssen von der Evaluation ausgeschlossen werden.

Die Kurven auf der linken Seite korrespondieren mit einem Verlust von genetischem Material, die Kurven auf der rechten Seite entsprechen einem DNA-Zugewinn. Die Inzidenz der Veränderungen ist an den 50%- und 100%-Linien parallel zu den Chromosomen ablesbar. Der Vorteil dieser Darstellungsform der CGH-Ergebnisse im Gegensatz zur klassischen Darstellung als Strichdiagramm ist, daß chromosomale Abschnitte ablesbar sind, in denen die Häufigkeit der Veränderung am größten ist. Gleichzeitig lassen sich kleinere minimal betroffene Regionen definieren.

Mehr als 50% der untersuchten Fälle zeigten Deletionen der chromosomalen Regionen 1p21-p22, 2q36, 3p, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p13-p21, 10q, 11p12-p14, 11q14-q22, 12q21, 13q, 18q und 21q21 sowie DNA-Überrepräsentationen auf 1q, 3q, 5p, 8q, 9q34, 11q13, 12p, 16p, 17q12-q21, 17q24-q25, 19, 20q und 22q.

Je ein Histogramm wurde auch für metastasierte bzw. nicht-metastasierte Plattenepithelkarzinome erstellt und statistisch auf Signifikanz einzelner Veränderungen in den entsprechenden Subgruppen über χ^2 -Test untersucht. Das resultierende Differenzhistogramm ist in Abbildung 7 dargestellt. Es basiert auf dem Vergleich von 25 Primärtumoren ohne Evidenz von Metastasen (Tumorstadium pN0/M0) sowie 25 metastasierten Tumoren (pN+/M+). In den metastasierten Tumoren überwiegen die genetischen Veränderungen, was sich im Überschuß der roten Farbe ausdrückt. Regionen mit statistisch signifikanten Veränderungen im Vergleich beider Tumorsubgruppen nach χ^2 -Test sind als Balken dargestellt. Graue Balken entsprechen dabei den Regionen mit 95%-iger Signifikanz ($0.01 < p < 0.05$), schwarze Balken denen mit 99%-iger Signifikanz ($p < 0.01$). Insbesondere zeigten sich DNA-Verluste in den chromosomalen Regionen 3p12, 4p16, 6p22, 6q26, 8p23, 10q21-q24, 10q26 und 21q22 sowie DNA-Überrepräsentationen der Banden 8q24, 9q34 und 15q11-q13 als hochsignifikant für den metastatischen Phänotyp der

Plattenepithelkarzinome. Veränderungen mit 95%-iger Signifikanz waren Überrepräsentationen von 1q21-q25, 6p23-p24, 6q25, 6q27, 8q und 11q13.

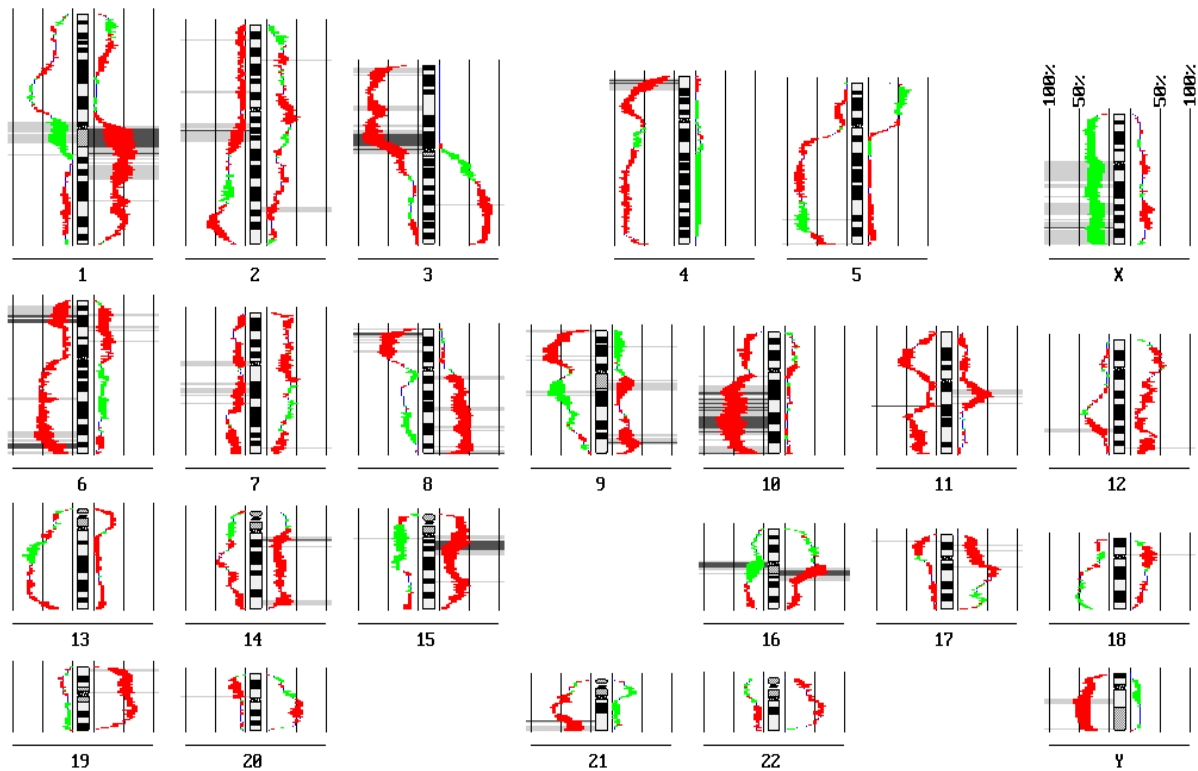


Abb.7 Differenzhistogramm von nicht-metastasierten (grün)- und metastasierten (rot) Plattenepithelkarzinomen der Lunge. Regionen mit statistisch signifikanten Veränderungen im Vergleich beider Tumorsubgruppen nach χ^2 -Test sind als Balken dargestellt. Graue Balken entsprechen dabei den Regionen mit 95%-iger Signifikanz ($0.01 < p < 0.05$), schwarze Balken denen mit 99%-iger Signifikanz ($p < 0.01$).

Der direkte Vergleich von 10 Primärtumoren und den korrespondierenden Metastasen zeigte eine überwiegende Anzahl gleicher chromosomaler Veränderungen in den Tumoren desselben Patienten, was für einen klonalen Zusammenhang spricht. Weiterhin bestätigte es die statistisch gefundenen Regionen. Obwohl nicht alle metastasierungs-assoziierten Veränderungen in jedem

Fall aufzufinden waren, konnten sie meist bereits im Primärtumor beobachtet werden. In einigen Fällen waren diese Veränderungen jedoch in den Metastasen deutlicher ausgeprägt.

Beispiele hierfür sind in Abbildung 8 dargestellt.

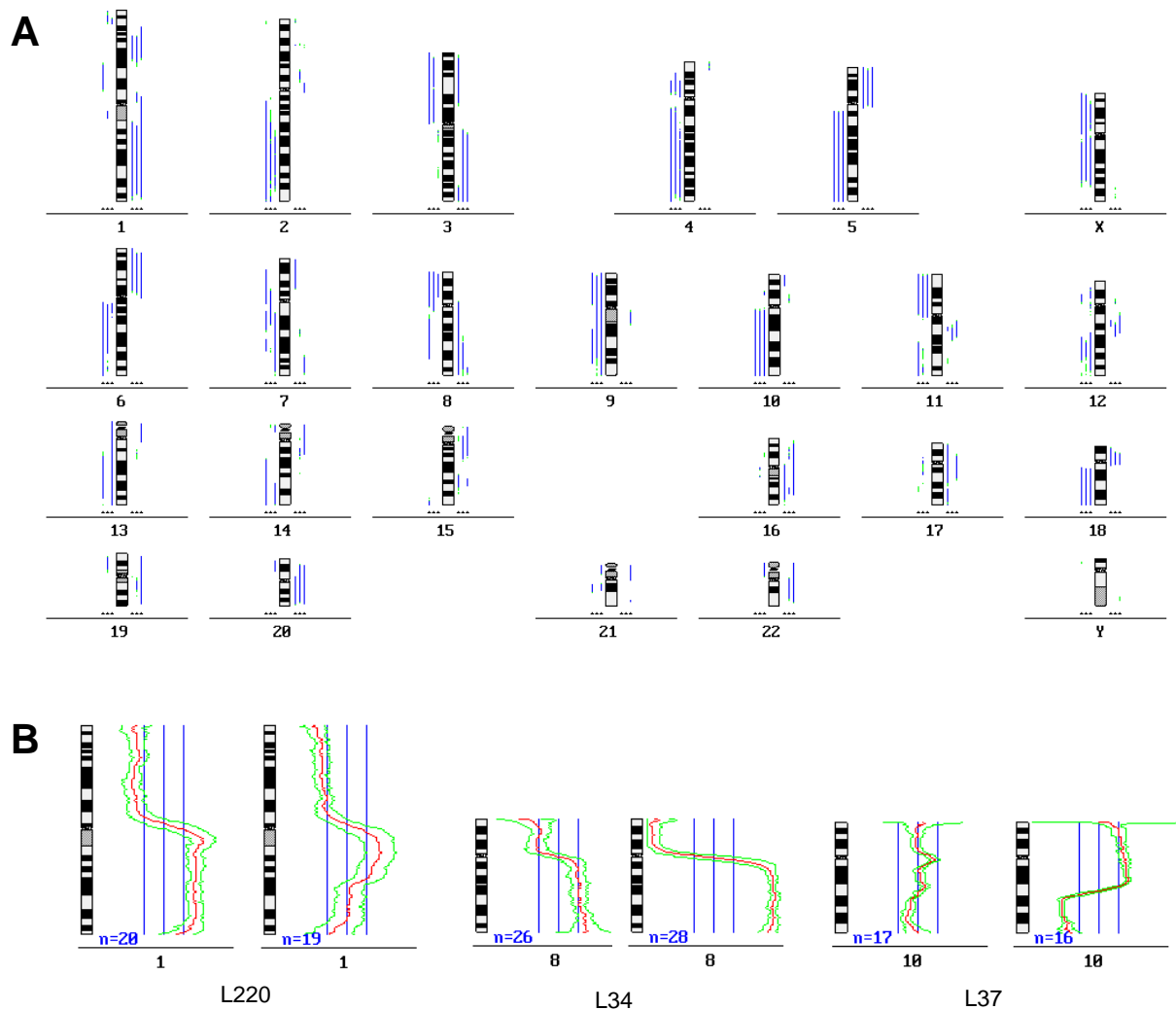


Abb. 8 Vergleich chromosomaler Veränderungen von Primärtumoren und korrespondierenden Metastasen. (A) CGH-Strichdarstellung eines Primärtumors (Striche in der indizierten Position nahe am Chromosomenideogramm) und einer großen und kleinen Lebermetastase (Striche in der mittleren und äußeren Position). (B) Profile von Primärtumor und je einer Metastase für drei Chromosomen mit metastasierungsrelevanten Loci.

Abbildung 8A zeigt das Ergebnis der CGH-Analyse von einem Primärtumor und zwei korrespondierenden Lebermetastasen. Die Profile zeigen für die Chromosomen 2q, 6q und 8 eine Ausweitung der Deletionen im Laufe der Progression. Die Deletion der Bande 3p12 war nicht im Primärtumor detektierbar. Beispiele für die Chromosomen 1, 8 und 10 sind in Abbildung 8B aufgeführt.

4.2 Allelverluste auf Chromosom 10q in der Progression und Metastasierung von Lungenkarzinomen

Die Allelotypisierungsstudien an 22 Kleinzellern, 40 Plattenepithelkarzinomen, 11 Adenokarzinomen, 4 großzelligen Lungenkarzinomen sowie einem Karzinoid mit zunächst 6 polymorphen Markern zeigten Allelverluste (LOH) in 91% der SCLC und 56% der metastasierenden Plattenepithelkarzinome. Während nicht-metastasierte Plattenepithelkarzinome lediglich in 14% LOH zeigten, war kein LOH in den übrigen NSCLC detektierbar. Die Assoziation mit der Metastasierung und Progression war statistisch hochsignifikant ($p < 0.01$). Einzelheiten zu dieser Studie sind dem beigefügten Sonderdruck Petersen et al, 1998a zu entnehmen.

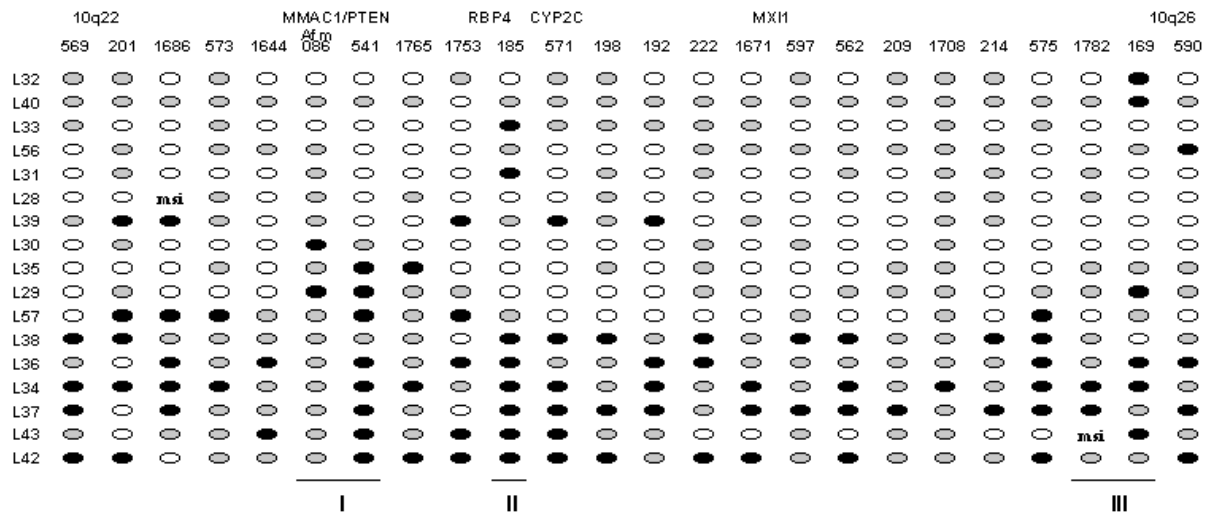


Abb. 9 Ergebnisse der Allelotypisierungs-Analyse in den 17 Plattenepithelkarzinomen mit Allelimbalanz. Die Marker sind in der oberen Reihe ohne den Präfix D10S aufgeführt. Kleine Zahlen dazwischen geben die genetische Distanz zwischen den einzelnen Markern in cM an. Schwarze Ellipsen entsprechen LOH, weiße Heterozygotie. Nicht-informative Marker sind grau dargestellt. Die drei minimal deletierten Regionen sind markiert. msi, Mikrosatelliten-Instabilität.

Im Gegensatz zu den Kleinzellern, welche in der Regel den Verlust einer gesamten Chromosom 10q-Kopie aufwiesen, zeigten die Plattenepithelkarzinome gehäuft interstitielle Deletionen. Daher wurde in einer zweiten Studie insbesondere dieses Tumorkollektiv herangezogen, um die minimal deletierten Regionen näher einzuengen. Siehe dazu auch den Artikel Petersen et al, 1998b.

Insgesamt waren in 17 der untersuchten 39 Plattenepithelkarzinome einer oder mehrere Allelverluste nachweisbar. Das Ergebnis dieser Arbeit ist in Abbildung 9 dargestellt. Es ließen sich drei minimale Regionen flankiert von den Markern Afm086/D10S541, D10S185 und D10S1782/D10S169 definieren.

4.3 Mutationsanalyse der Kandidatengene MXI1, PTEN/MMAC1 und DMBT1 auf Chromosom 10

Wie in Abbildung 9 ersichtlich, liegen die Kandidatengene MXI1 und PTEN/MMAC1 in unmittelbarer Nähe von minimal deletierten Regionen. Mittels SSCP-, Southern Blot-Analyse sowie direkter Sequenzierung konnten Mutationen innerhalb dieser Gene in den vorcharakterisierten Tumorkollektiven der Lunge ausgeschlossen werden. Die Untersuchungen auf RNA-Ebene ergaben weder eine Herabregulation in Zelllinien noch alternative Transkripte in Tumoren. Diese Ergebnisse sind in den Arbeiten Petersen et al, 1998a und b erläutert.

Die Analyse des Genes DMBT1 (deleted in malignant brain tumors), welches in der Region 10q25.3-10q26.1 identifiziert wurde (Mollenhauer et al, 1997), zeigte in Lungentumoren keine homozygoten Deletionen. Die SSCP-Analysen von genomischer DNA aus dem Gen sowie von amplifizierten cDNA-Abschnitten zeigte Veränderungen im Laufverhalten. Da diese jedoch ausschließlich auch im korrespondierenden Normal-Gewebe nachweisbar waren, muß von Polymorphismen innerhalb dieses Gens ausgegangen werden. Ein Beispiel einer SSCP-Analyse ist in Abbildung 10 dargestellt.

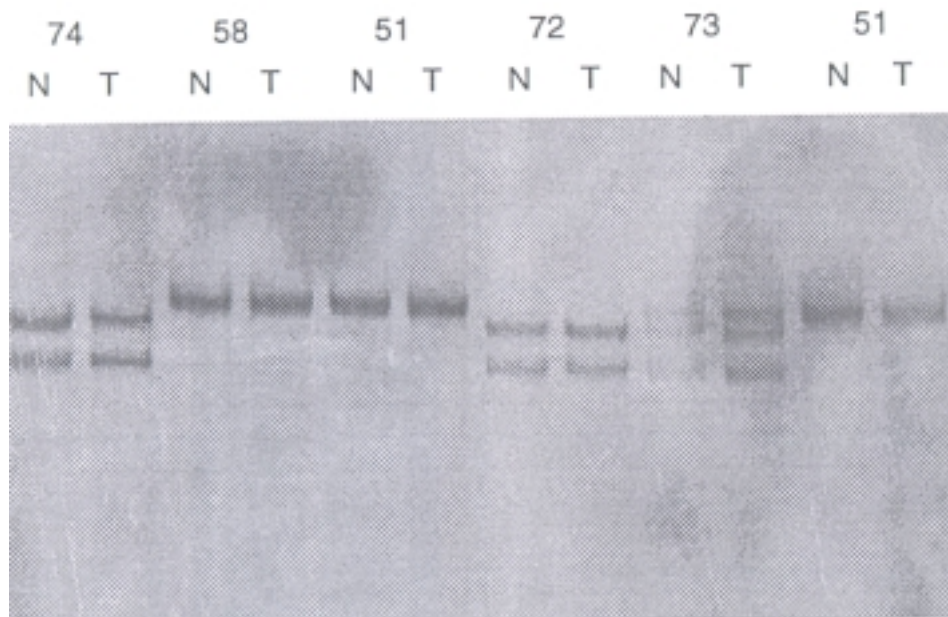


Abb. 10 Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse von PCR-Produkten des STS 74k innerhalb der genomischen Sequenz des DMBT1-Gens. T, Tumor-DNA; N, korrespondierende normale Lungengewebs-DNA. Unterschiede im Laufverhalten zwischen einzelnen Patienten sind durch Polymorphismen des Gens verursacht.

Ebenfalls auf cDNA-Ebene zeigten amplifizierte PCR-Fragmente bei der SSCP-Analyse Veränderungen im Laufverhalten. Die Sequenzierung ergab einen Nukleotidaustausch sowohl im Tumor- als auch im Normal-Gewebe. Abbildung 11 zeigt einen Ausschnitt der Sequenzierung dieses Fragmentes im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz. Es zeigte sich ein Austausch der Basen 3416 bis 3418 von CAC zu AGT.

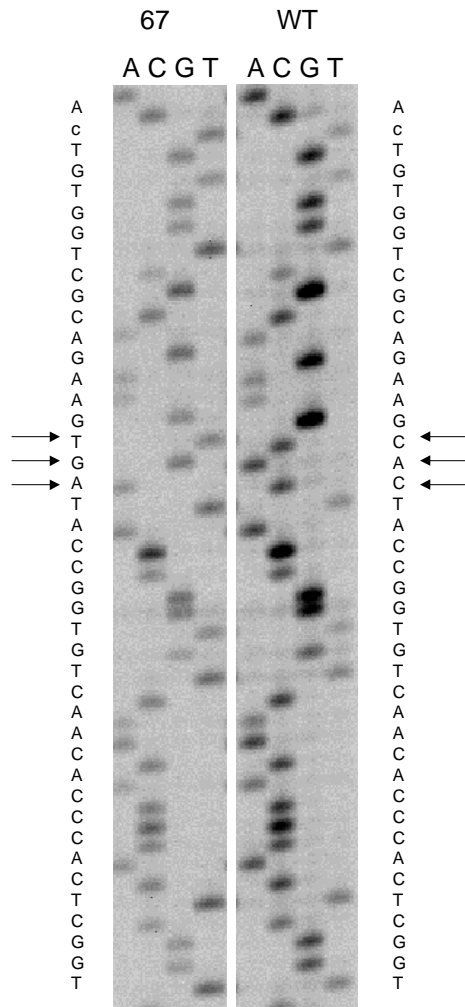


Abb. 11 Sequenzierung von PCR-Produkten aus dem DMBT1-Gen. Rechts ist ein Teil der Wildtyp-Sequenz sichtbar, links ein Fragment des Falles 67. Die Sequenz ist ablesbar und ergibt einen Austausch der Basen 3416 bis 3418 von CAC zu AGT.

Die Northern Blot-Hybridisierung mit einer Sonde gegen das DMBT1-Gen ergab die Expression vergleichbarer Transkriptmengen in Tumorzelllinien und in normalen Bronchialepithelzellen (SAEC). Bei den Southern Blot-Untersuchungen waren keine homozygoten Deletionen bzw. Rearrangements detektierbar.

4.4 Differenziell exprimierte Gene in Lungenkarzinomzelllinien

Zur Identifizierung neuer Kandidatengene in der Progression und Metastasierung von Lungentumoren wurden zwei Bibliotheken kloniert, die cDNA-Fragmente von vornehmlich herauf (I.Bibliothek)- bzw. herabregulierten (II.Bibliothek) Genen enthielten. Es wurden jeweils 315 bzw. 437 Klone gepickt und zur Plasmid-Präparation kultiviert. Davon wurden mittlerweile 457 Klone sequenziert. Der Sequenzvergleich mit der Datenbank des NCBI ergab Homologien zu bekannten Genen oder in voller Länge sequenzierter cDNAs in 78 (in I) und 99 (in II) Fällen, was einem Prozentsatz von weniger als 40% entspricht. Während bei lediglich 7% der Fragmente keine Homologie zu einem Eintrag in der Datenbank vorlag, konnten zu der Mehrheit der Genfragmente eine oder mehrere überlappende Sequenzen gefunden werden, welche von sogenannten EST's (expressed sequence tags) stammen, d.h. aus ansequenzierten Genen, deren gesamte cDNA-Sequenz bzw. Funktion noch nicht aufgeklärt wurde. Um die Qualität der Bibliotheken zu überprüfen, wurden Northern Blot-Untersuchungen durchgeführt, um die differentielle Expression der einzelnen Klone zu überprüfen. Dazu wurde RNA von einer anderen Passage eingesetzt als zur Erstellung der Bibliotheken verwendet wurde, um eventuell auftretende Zellzyklus-Schwankungen auszuschließen. Es wurden bislang schwerpunktmäßig die bekannten Gene oder von ihrer genomischen Lokalisation interessante Fragmente getestet. Die Blots wurden mit β -Actin kontroll-hybridisiert und die Expression zwischen Tumor- und Normal-Zellen visuell verglichen: +++ entsprach starker Expression, ++ mittlerer Expression, + schwacher Expression, - keiner Expression. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt. Diese beinhaltet lediglich bereits im Northern Blot überprüfte Sequenzen. Generell kann von Unterschieden in 30-40% der klonierten Genfragmente ausgegangen werden.

Tab. 4: Auflistung klonierter cDNA-Fragmente und der Northern Blot-Ergebnisse

Klon	Match in der NCBI-Datenbank	Insert	Transkr.	N	T
I					
1	NY-CO-25	550 bp	1	+	++
3	some overlapping	607 bp	1	-	(+)
5	yw89a06.s1 Homo sapiens cDNA clone 259378	350 bp	2	(+)	+
6	AIM1	700 bp	1	++	-
7	nt99c10.s1 NCI_CGAP_Alv1 Homo sapiens cDNA	250 bp	1	+	+
8	no match	700 bp	1	-	+
9	no match	400 bp	1	+	+
10	AIM1	400 bp	2	++	-
11	KIAA0078	608 bp	1	+	+++
12	Deoxycytidin-kinase	650 bp	1	+	+
13	no match	650 bp	2	+	++
15	OXA1HS involved in cyt. c oxidase assembling	500 bp	1	+	+++
17	several ESTs	350 bp	1	++	++
18	no match		1	+	+
19	several ESTs	700 bp	1	+	+
20	ns66c12.r1 NCI_CGAP_Pr22 Homo sapiens cDNA	700 bp	1	++	++
21	yi90b07.r1 Homo sapiens cDNA clone 146485	527 bp	1	+	+
22	several ESTs		1	++	++
30	ribosomal S4 protein		1	+++	+++
31	Ran_GTP binding protein 5	>526 bp	1	-	+
33	no match	475 bp	1	-	+
36	several ESTs	155 bp	1	+	+
37	EST58841 Infant brain Homo sapiens cDNA	230 bp	1	+	+
38	no match	480 bp	1	++	++

43	S4 protein		1	+++	+++
44	cytochrome oxidase	500 bp	1	+	++
45	PAC 1q24-q25	400 bp	1	-	++
48	some overlapping ESTs	ca.600 bp	1	+	+
49	cytokeratin 18	400 bp	1	-	++
50	ERM-binding protein	550 bp	1	++	+
51	EF 1-alpha		1	++	++
53	no match	>450 bp	1	+++	+++
54	qb94g05.x1 Soares_fetal_heart_NbHH19W Homo sapiens	336 bp	1	+	+
59	KIAA0063	>500 bp	1	+	++
71	nz04d08.s1 NCI_CGAP_GCB1 Homo sapiens cDNA	>450 bp	1	(+)	++
81	Human tra1 mRNA for human homologue of murine tumor rejection antigen gp96	487 bp	1	++	++
83	elongation factor 1-alpha	442 bp	1	++	++
94	EST178957 HCC cell line	>400 bp	1	+	++
95	Human putative transmembrane protein precursor (B5)	300 bp	1	(+)	++(+)
121	testis mitotic checkpoint BUB3	487 bp	2	++/++	++/+++
123	acidic ribosomal phosphoprotein P0	550 bp	1	+++	+++
124	Human histone (H2A.Z) mRNA	>500 bp	2	++/-	++/+
129	clk2 mRNA	>570 bp	1	(+)	++
130	Human mRNA for high mobility group-1 protein (HMG-1)	>565 bp	2	+	+++
131	vacuolar H(+)-ATPase subunit=13.7 kda F-ATPases subunit b homolog	352 bp	1	+++	++
138	mRNA for La/SS-B protein	380 bp	1	+	++
142	Ser/Arg-related nuclear matrix protein (SRM160)	>500 bp	1	++	+++

154	DNA-binding protein (CROC-1B)	>500 bp	2	++	++
176	Grb14	>550 bp	1	-	++
181	Proteasom-Subunit		1	+++	+++
200	Human calpastatin	600 bp	2	+++	+++
202	Human p62	>590 bp	1	++/-	++/+
205	BAC 747E2 on chromosome 22q12.1	500 bp	1	+++	+++
206	ubiquitin carboxyl extension protein	>380 bp	1	++	++
217	M-phase phosphoprotein, mpp9	ca. 400 bp	1	+	+
229	cytokeratin 18	375 bp	2	-	++
230	p300	>433 bp	2	+	+++
238	mitotic checkpoint protein kinase (BUB1)	>600 bp	1	++	++
243	BAC 747E2 on chromosome 22q12.1	>660 bp	1	+++	-
249	some overlapping ESTs	>500 bp	1	-	+
259	Homo sapiens transcriptional enhancer factor (TEF1)	485 bp	1	+	++
260		554 bp	1	++	++
266	Mus musculus WW-domain binding protein 2	333 bp	1	+	+
283	nonerythroid beta-spectrin mRNA	250 bp	1	+	+
296	Human keratin 18	514 bp	1	-	++
306	Pr22 protein	378 bp	1	+	++
312	serine/threonine kinase (BTAK)/aurora-related kinase 1 (ARK1),20q13.2-q13.3	>586 bp	1	-	++
II					
1	DNA sequence from PAC 130N4,13q12-13	>500 bp	1	+++	+++
4	Cdc25C associated protein kinase C-TAK1	>600 bp	1	++	+
7	163-247bp:EST56970 Infant brain Homo sapiens cDNA	355 bp	1	++	(+)
8	163-340bp:EST56970 Infant brain Homo sapiens cDNA	350 bp		-/++	++/++

12	bis 225 bp:several EST in normal tissue and ovary tumor	>500 bp	1	+	+(+)
16	vimentin	>500 bp	1	++	++
17	ny11g03.s1 NCI_CGAP_GCB1	>500 bp	1	(+)	++
24	83-480bp:ml45c01.r1 Stratagene mouse testis (#937308)	>600 bp	1	+++	+++
51	replication factor C, activator 1	>500 bp	1	-	+
61	ow37c07.s1 Soares_parathyroid_tumor_NbHPA	>500 bp	1	-	++
67	ow52e04.x1 Soares_parathyroid_tumor_NbHPA	250 bp	1	-	++
82	234-579bp: TEGT gene, 12q12-q13		1	++	+
85	ezrin	252 bp	1	+	++
91	PAC 163M9 on chromosome 1p35.1-p36.21	>400 bp	3	+	+
92	plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) gene, exon 8	>160 bp	1	++	-
115	several overlapping est	>600 bp	1	+	+
118	22-188 bp:12q24 PAC RPC11-315L15	>450 bp	1		
119	translation initiation factor eIF3 p48 subunit INT6	>450 bp	1	+	+++
123	zl05h11.r1 Soares pregnant uterus NbHPU	>625 bp	1	+++	-
140	nuclear pore complex protein NUP107	>625 bp	1	+	++
141	thrombospondin	375 bp	1	+++	-
142	fibronectin receptor alpha subunit	332 bp	1	++	-
146	bis 400 no match, 400-600 bp phosphorylase-kinase	>600 bp	1	+	+
150	nuclear protein SDK3, desmosomal protein	506 bp	1	-	+
154	H.sapiens P1-Cdc21 (DNA-replication)	>530 bp	1	-	++
157	za04g09.r1 Soares melanocyte 2NbHM	>500 bp		++/+	-/+
158	thrombospondin	>410 bp	1	+++	-
173	bis 250 bp: 28 kDa heat shock protein	>350 bp	1	++	++
185	CUSP,p73H, p51B (members of p53 family)	>578 bp	1	++	-
186	clones 24609 and 24716 beta-tubulin	235 bp	2	++	+++

187	herpesvirus associated ubiquitin-specific protease	>460 bp	2	+	+
191	PAC 265J14 on chromosome 6	>352 bp	1	-	++
192	pre-B cell enhancing factor (PBEF), GOS9 mRNA	328 bp	2	++	++
193	EST20610 Spleen I H.sapiens cDNA 5' end similar to lamin B receptor	186 bp	1	-	++
200	zb47c01.r1 Soares fetal lung NbHL19W	290 bp	1	++	++
205	Arp2/3 protein complex subunit p34-Arc (ARC34), BRCA2	465 bp	1	+++	++
207	PAC 370M22 on chromosome 22q12-qter	335 bp	1	++	++
217	nuclear ribonucleoprotein particle (hnRNP) C	>600 bp	1	+++	+++
218	PAC 163M9 on chromosome 1p35.1-p36.21	>439 bp	3	+	+
223	cellular fibronectin	>600 bp	1	+++	+
228	rab11a GTPase	>613 bp	1	++	++
229	chromosome 17, clone HRPC837J1	>788 bp	2	+	++
234	DEAD box RNA helicase-like protein 11q22-q23	>617 bp	2	+	+++
237	222-605bp:ab49h07.r1 Stratagene lung carcinoma 937218	>500 bp	2	+	+
244	Sm protein G	384 bp		++	+++

Es sind die Gene aufgeführt, die aus der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>) ermittelt werden konnten. Wurden keine Homologien zu bekannten Genen gefunden, wurde die entsprechende EST-Datenbank abgefragt. Oft waren bereits zahlreiche überlappende Einträge gefunden, was mit dem Eintrag „several ESTs“ vermerkt wurde. Falls Ähnlichkeiten zu bekannten Genen vermerkt waren, wurde das ebenfalls aufgeführt. Die Insertlänge wurde nach dem Sequenzierresultat vermerkt und gibt die Insertlänge abzüglich Vektor an, der sequenziert wurde.

Beispiele ausgewählter Blots gibt Abbildung 12.

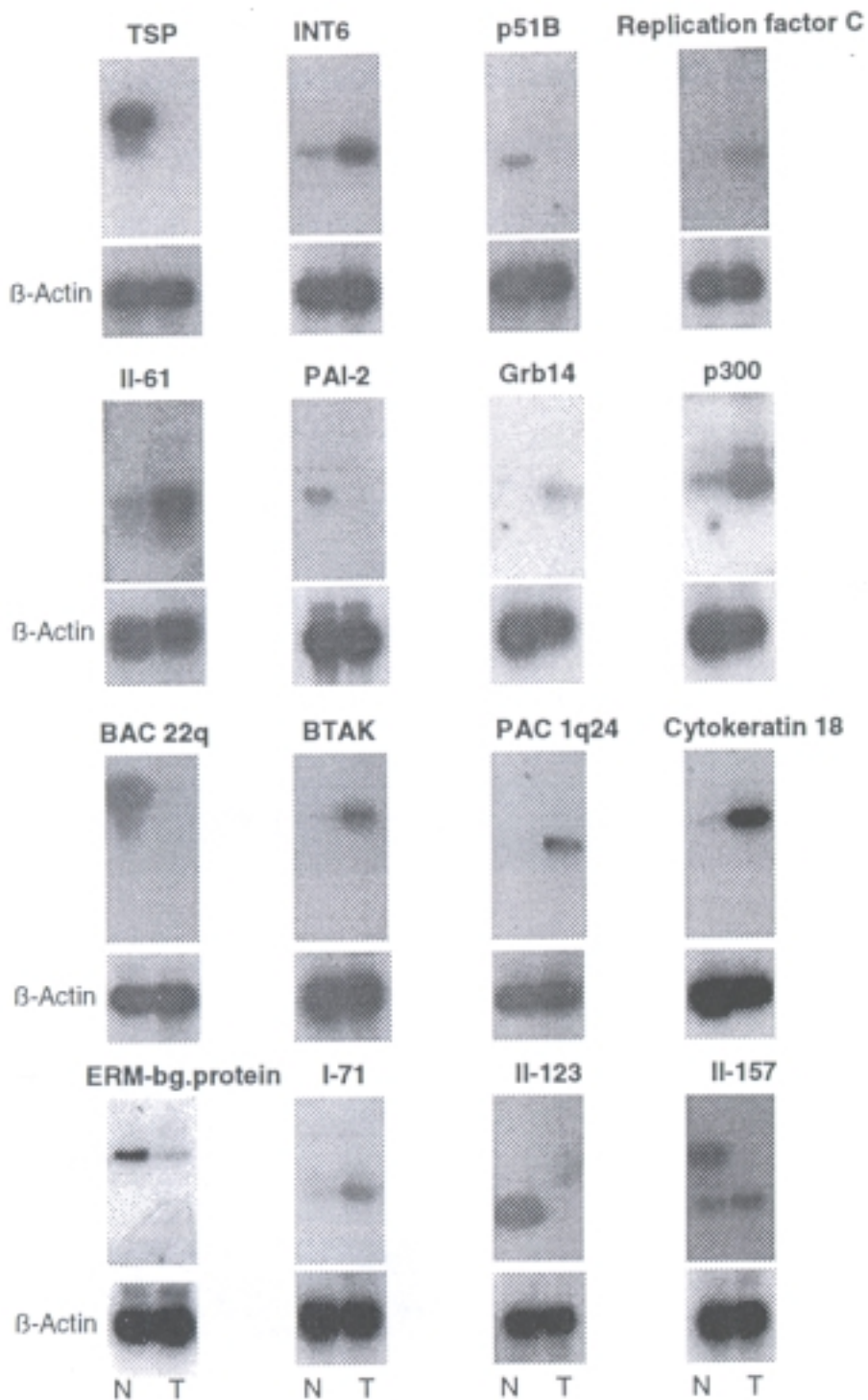


Abb. 12 Beispiele von Northern Blot-Untersuchungen differentiell exprimierter Gene. N: normales Bronchialepithel (SAEC), T: metastasiertes Adenokarzinom (D51). Die gleichmäßige Beladung der Gele wurde mittels β -Actin-Kontroll-Hybridisierung bestätigt.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und die Übertragbarkeit auf andere Lungenkarzinome zu überprüfen, wurde zunächst von drei interessanten Klonen die Expression in weiteren Zelllinien überprüft. Abbildung 13 zeigt die Expressions-Untersuchungen des Genes AIM1 (absent in melanoma) auf Chromosom 6q21, welches in der Karzinomzelllinie herunterreguliert war. Es zeigte sich in 4/13 Zelllinien eine deutlich verminderte sowie in 9/13 eine fehlende Expression.

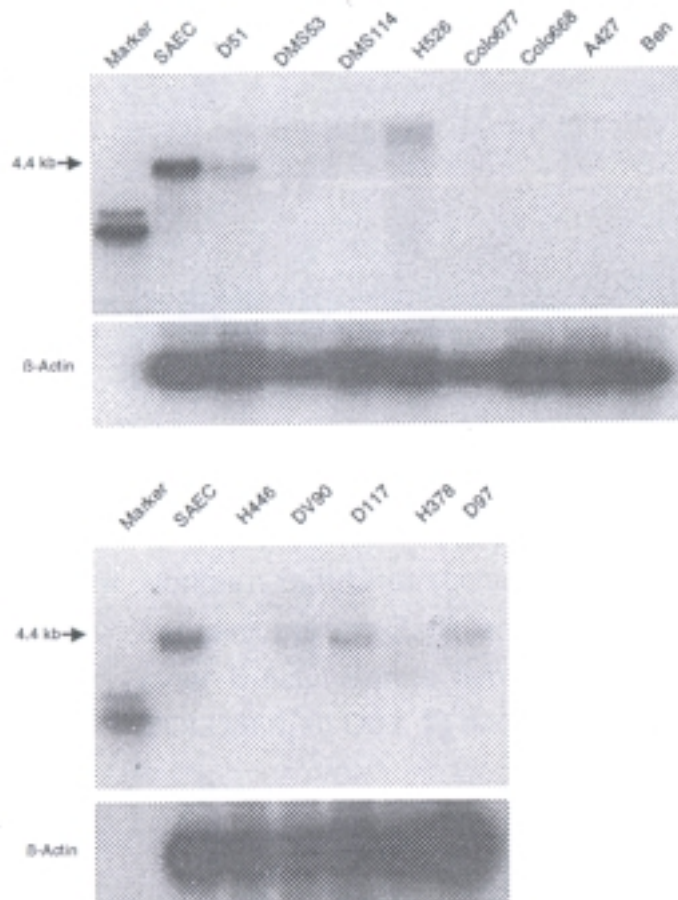


Abb. 13 Northern Blot-Untersuchung des AIM1-Genes in Lungenkarzinom-Zelllinien.

Die Northern Blot-Untersuchungen des Genes p51 ergaben eine fehlende Expression in 13/13 Lungentumorzelllinien.

Die Expression von dem Klon II-45, welche deutliche Homologie zu dem vom

Sanger-Zentrum sequenzierten PAC HS102G20 auf Chromosom 1q24-q25 ergab, wurde ebenfalls in mehreren Lungenkarzinom-Zelllinien untersucht. Im Vergleich zum Normalepithel, wo nur eine sehr schwache Expression sichtbar war, zeigten alle Tumorzellen eine mittlere bis starke Expression dieses Gens (Abbildung 14).

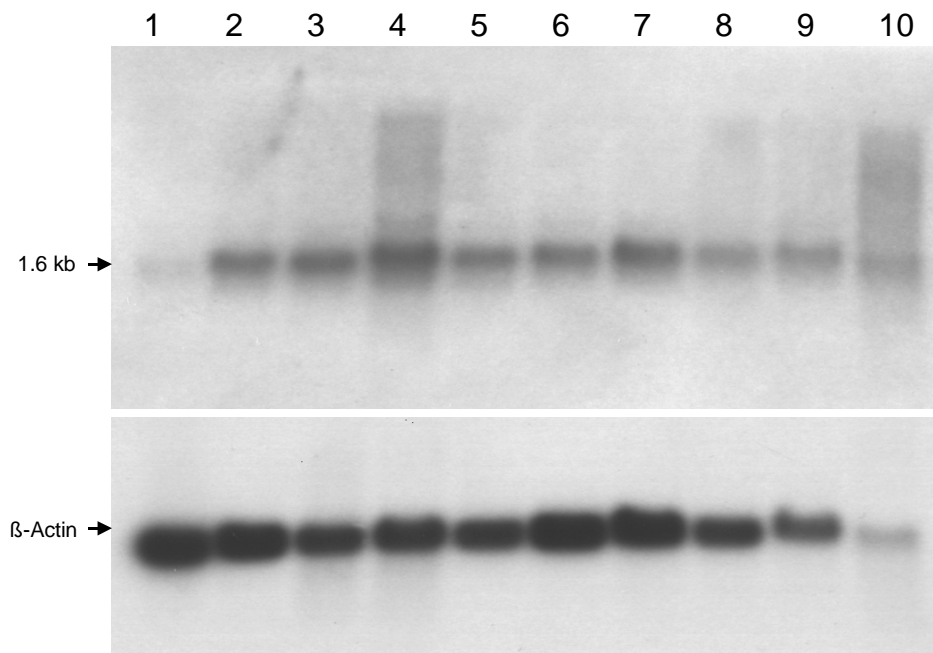


Abb. 14 Northern Blot-Untersuchung des Klonen II-45 auf Chromosom 1q24-q25 in Lungenkarzinom-Zelllinien. Dieselbe Membran wurde anschließend mit einer β -Actin-Sonde hybridisiert. 1) SAEC, 2) D117, 3) BEN, 4) H82, 5) COLO668, 6) D97, 7) A427, 8) H446, 9) DMS53, 10) CPC-N.

4.5 Charakterisierung des Genes für das humane Calcyclin-bindende Protein

Um die gesamte cDNA-Sequenz des Klonen II-45 von Chromosom 1q24-q25 zu ermitteln, sollten cDNA-Bibliotheken gescreent werden. Dazu wurde der Service vom Ressourcenzentrum innerhalb des Deutschen Humangenomprojektes in Anspruch genommen. Zunächst wurde jedoch die gewebespezifische Expression ermittelt, um

geeignete cDNA-Bibliotheken für die Suche zu ermitteln. Es zeigte sich eine Expression in der Mehrheit der untersuchten Gewebe, d.h. in Pankreas, Plazenta, Gehirn, Herz, Dickdarm, Dünndarm, Ovarien, Hoden, Prostata, Thymus und Milz. Besonders starke Expression zeigte die Skelettmuskulatur. Eine sehr schwache Expression zeigten Leber, Lunge und Niere (siehe Abbildung 15).

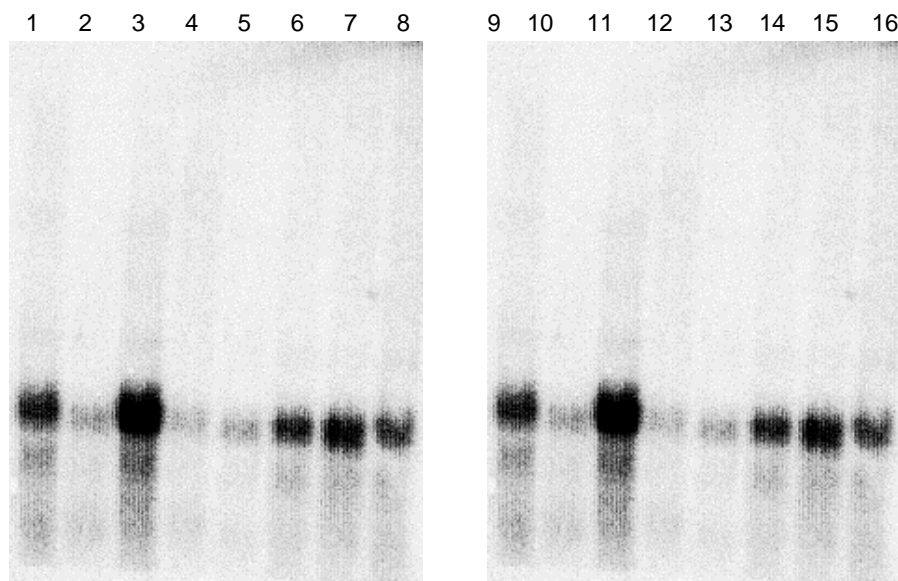


Abb. 15 Gewebespezifische Expression von Klon II-45 auf polyA-RNA-Northern Blots (CLONTECH): 1) Pankreas, 2) Niere, 3) Skelettmuskulatur, 4) Leber, 5) Lunge, 6) Plazenta, 7) Gehirn, 8) Herz, 9) Blutleukozyten, 10) Dickdarm, 11) Dünndarm, 12) Ovarien, 13) Hoden, 14) Prostata, 15) Thymus, 16) Milz.

In der Auswahl der Bibliotheken wurde auch die Qualität der dem Ressourcenzentrum zur Verfügung gestellten cDNA-Bibliotheken, insbesondere die durchschnittliche Fragmentlänge der klonierten Sequenzen, berücksichtigt. Es wurden 3 humane cDNA-Bibliotheken gescreent, vom Dünndarm (Bibliothek-Nr. 593), vom Pankreas

(Bibliothek-Nr. 562) und von Keratinocyten (Bibliothek-Nr. 550). Dabei wurden vier Klone identifiziert: DKFZp593O0924Q3, DKFZp593P0824Q2, MPMGp562M1231Q3 und ICRFp550I2355Q7. Die Stämme wurden auf LB-Platten vereinzelt, Klone gepickt und angezüchtet. Nach der Sequenzierung der Plasmide dieser Klone konnten zwei positive und zwei falsch-positive ermittelt werden. Die zwei positiven Klone DKFZ593P0824Q2 und MPMGp562M1231Q3 ergaben eine Transkriptlänge von 1537 bp der folgenden Sequenz:

1 gcaggctgca gcgccgcgac tcgtgcgggt aggcgtctgc gctcggtttg
51 agggctcggc gcgggggtttc ctgttcctcc ttctgcgcgg ctgcagctcg
101 ggacttcggc ctgaccacgc ccccatggct tcagaagagc tacagaaaga
151 tctagaagag gtaaagggtgt tgctggaaaa ggctactagg aaaagagtac
201 gtgatgccct tacagctgaa aaatccaaga ttgagacaga aatcaagaac
251 aagatgcaac agaaatcaca gaagaaagca gaacttcttg ataataaaaa
301 accagctgct gtggttgctc ccattacaac gggctatacg gtgaaaatca
351 gtaattatgg atgggatcag tcagataagt ttgtgaaaat ctacattacc
401 ttaactggag ttcacaaagt tcccactgag aatgtgcagg tgcatttcac
451 agagaggtca tttgatcttt tggtaaagaa tctaaatggg aagagttact
501 ccatgattgt gaacaatctc ttgaaaccca tctctgtgga aggcagttca
551 aaaaaagtca agactgatac agttcttata ttgtgtagaa agaaagtgga
601 aaacacaagg tgggattacc tgaccacagg tgaaaaggag tgcaaagaaa
651 aagagaagcc ctccatgac actgaaacag atccatagtg gggattgatg
701 aatgttctaa agaaaattta tgaagatgga gacgatgata tgaagcgaac
751 cattaataaa gcctgggtgg aatcaagaga gaagcaagcc aaaggagaca
801 cggaaattttg agactttaaa gtcgttttgg gaactgtgat gtgatgtgga
851 aatactgatg tttccagtaa gggaatattg gtgagctgca tatataaatt
901 tgacagatag ctatttacat agccttctaa gtaaaggcaa tgaattctcc
951 atttcctact ggaggattta tttaaataaa atatgcttat taaacactcc
1001 tgcaaagatg gttttattag taccctggtc attttgttca aggaagggtt
1051 atattgcatt ctcacgtgaa atataaaaag caagtcttgc ccaataaaaa
1101 cgctacattg tgtgtatttt ttgttcagct aagaattgga aaagtatttg
1151 cttgcctttt aagttactga catcagcttc caccagtgtg aaaattgagt
1201 aaaacctgaa gttttgcata aaatgcaa atcggtgcctgt gcttgaagggt
1251 tgctgtagag catctgaccc cttattacca ccttaagcaa tgtatatgcc
1301 atgcattacc atgcactaat tcaatcacag gtgtttctat ctagatttaa
1351 atatatattgt caatgaatgt ggaatagaaa atctaaacat gacaataata
1401 gacatatctt tgtatgggtac cagttagttt tgccgtggat cagatgggtt
1451 ataaaagtaa taaccataaa gcaaaaaata atttgaaagc ccgtctattc
1501 ctatgctcaa taaagttaag tttttcttca ttagaac

Der Sequenzvergleich mit der Datenbank ergab nun, daß es sich bei diesem Gen um das humane Calcyclin-bindende Protein (Accession-Nummer AF057356) handelt. Der Eintrag in der Datenbank zeigte, daß lediglich der 5'-translatierte Bereich des Transkriptes bekannt war. Die ursprünglich klonierte Sequenz stammte aus dem 3'-untranslatierten Bereich dieses Genes. Die Untersuchung der Basenabfolge ergab einen offenen Leserahmen von den Basen 125 bis 811 (siehe unterstrichene Codons). Es finden sich ab 1394 bp und 1509 bp zwei Polyadenylierungssignale AATAA.

Das humane Gen besitzt 87% Homologie zum Gen für das Calcyclin-bindende Protein der Maus.

Über Sequenzvergleiche mit dem PAC-Klon HS102G20 vom Sanger-Zentrum konnte die genomische Struktur des Genes ermittelt werden. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, umfaßt es 6 Exons und überspannt einen 10,7 kb-langen Bereich genomischer DNA.

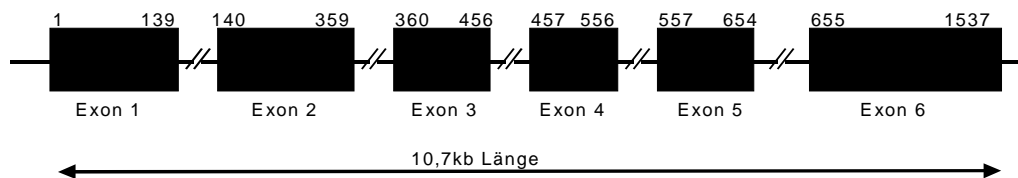


Abb. 16 Genomische Struktur des humanen Calcyclin-bindenden Proteins. Schwarze Balken entsprechen den Exons. Das Gen überspannt 10,7 kb genomische DNA.

Tab. 5: Exons und flankierende intronische Sequenzen (fettgedruckt/unterstrichen)

Exo	Größe	Intro	Größe
1	139	1	4418
2	220	2	1911
3	97	3	256
4	100	4	1411
5	98	5	1215
6	883		

Alle identifizierten Intron/Exon-Grenzen werden von den konservierten GT/AG-Dinukleotiden flankiert. Die Länge der Exons bzw. Introns und die entsprechenden Exon/Intron-Grenzen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

```

-300      cgggtcaaatttataaacataaaaagttgtcagggcggagagcaagacatta
-250      ctcttctcggattgccggttcgctcgcgagacttgagcgttgctaggaga
-200      ttcggcaggcgggccgagaccagactcgcgggcgcgggcaggggtggggct
-150      aggctcggcagggcgaggaaggggtgggtggagccaggcttgcgggcctgt
-100      gcgtgctcgcggtgggcggtggcggcggtgcctcgcgaagggttcgagat
-50       ccgtcgcgtgcgggagggcgggcgcgatcttgcgagggtcggtgtgggc
  1       gcaggctgcagcgccgcgactcgtgcgggtaggcgtctgcgctcggtttg
  51      agggctcggcgcggggtttcctgttcctccttctgcgcggtgcagctcg
 101      ggacttcggcctgaccagcccccatggcttcagaagagctacagaaaga
 151      tctagaagaggtaaagggtgttgctggaaaaggctactaggaaaagagtac

```

Abb. 17 Promotorregion des Gens für das Calcyclin-bindende Protein. Der transkribierte DNA-Bereich ist fettgedruckt. Es finden sich mehrere SP1-Bindungsstellen GGCGGG sowie eine TATAA-Box, welche unterstrichen sind. Das ATG-Startcodon ist ebenfalls unterstrichen.

In Abbildung 17 ist die 300 bp aufwärts des Gens gelegene Promotor-Sequenz angegeben. Es finden sich mehrere SP1-Bindungsstellen sowie eine TATA-Box, die 285 bp vor dem vermutlichen Transkriptionsstart gelegen ist.

Aus dem offenen Leserahmen ergibt sich folgende 228 Aminosäuren umfassende Proteinsequenz:

```

MASEELQKDLEEVKVLLEKATRKRVRDALTAEKSKIETEIKNKMQQKSQKKAELLDNEKPAA
VVAPITTYGTVKISNYGWDQSDKFVKIYITLTGVHQVPTENVQVHFTERSFDLLVKNLNGKS
YSMIVNNLLKPISVEGSSKKVKTDTVLILCRKKVENTRWDYLTQVEKECKEKEKPSYDTETD
PSEGLMNVLLKKIYEDGDDDMKRTINKAWVESREKQAKGDTEF

```

Die Proteinsequenzanalyse über die EXPASY-Internetseiten des Schweizer Instituts

für Bioinformatik (<http://expasy.hcuge.ch/>) ergab für die Aminosäuren 143 bis 160 ein nukleäres Lokalisationssignal.

Weiterhin ergaben sich folgende Homologien zu Phosphorylierungsstellen:

(1) Protein-Kinase C-Phosphorylierungsstellen:

21-23 TRK

48-50 SQK

72-74 TVK

83-85 SDK

109-111 TER

141-143 SSK

142-144 SKK

(2) Casein-Kinasell-Phosphorylierungsstellen:

34-37 SKIE

161-164 TRWD

167-170 TQVE

183-186 TETD

(3) Tyrosin-Kinase-Phosphorylierungsstelle:

174-181 KEKEKPSY

Der PAC-Klon HS102G20 vom Sanger-Zentrum wurde angefordert, um auf chromosomaler Ebene nach Amplifikationen bzw. Rearrangements dieses Gens in Lungentumoren zu schauen, da die CGH-Analysen von den unter Abschnitt 2.3 aufgelisteten Zelllinien zeigten, daß in 15 von 22 Lungenkarzinom-Zelllinien eine DNA-Überrepräsentation im Bereich 1q24-q25 vorlag.

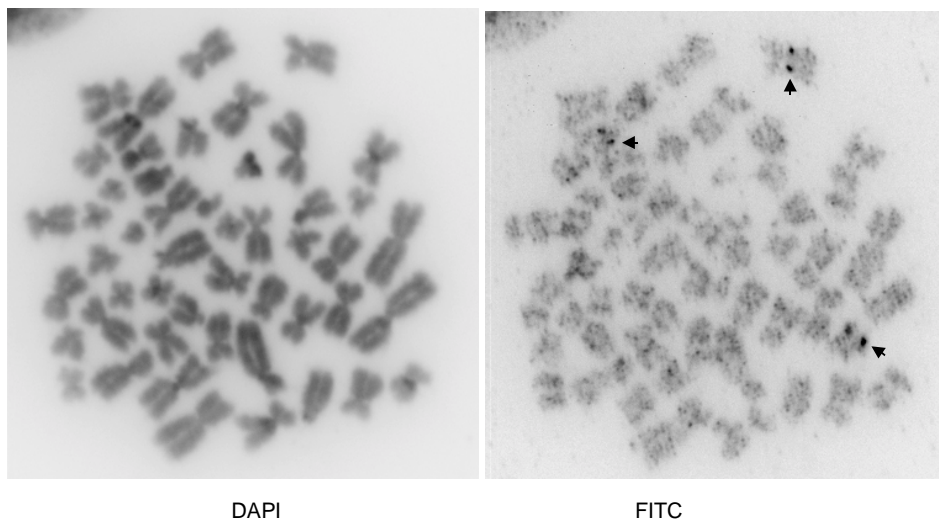


Abb. 18 Fluoreszenz-in situ- Hybridisierung einer Tumormetaphase der kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie H209 mit dem PAC HS102G20, der das Gen für das humane Calcyclin-bindende Protein enthält. Links) DAPI-Färbung zur Identifizierung der Chromosomen, rechts) FITC-Signal mit zwei Signalen auf den Chromosomenabschnitten 1q24-q25 und ein drittes Signal auf einem aberranten Chromosom, welches über DAPI-Färbung nicht identifizierbar ist. Die spezifischen Signale sind mit Pfeilen angezeigt.

Die PAC-Klone wurden angezüchtet, und über Southern-Blot-Untersuchungen konnte bestätigt werden, daß sie das Gen für das humane Calcyclin-bindende Protein enthalten. Auf normalen Metaphasen aus Blutlymphocyten wurde die

Lokalisation auf den Banden 1q24-q25 bestätigt. Die Hybridisierung dieses PAC-Klones auf Tumor-Metaphasen ergab bei den meisten untersuchten Tumorzelllinien mehr als zwei Signale in der überwiegenden Anzahl der Metaphasen sowie in den Zellkernen. Unter Berücksichtigung der Ploidie der Tumorzellen konnten über die FISH-Ergebnisse damit die CGH-Daten verifiziert werden. Ein Beispiel für diese FISH-Analyse zeigt Abbildung 18.

Es ist davon auszugehen, daß es sich bei der Überexpression dieses Gens sowohl um transkriptionelle Aufregulation handelt, die auch durch eine genomische Mutation bedingt ist.

5 Diskussion

5.1 CGH-Ergebnisse

Die komparative genomische Hybridisierung wurde erstmalig 1992 beschrieben (Kallioniemi et al, 1992; Du Manoir et al, 1993) und hat sich inzwischen als Screening-Verfahren in der Tumorgenetik durchgesetzt. Trotz der Limitation im Auflösungsvermögen bietet sie Vorteile, insbesondere kann durch nur eine Untersuchung ein komplexes Bild von den chromosomalen Veränderungen eines Tumors ermittelt werden.

Die Bedeutung einzelner Loci kann nur ermittelt werden, wenn die Inzidenz der einzelnen Veränderungen an größeren Tumorkollektiven bekannt ist. Die CGH-Studie an 50 Plattenepithelkarzinomen zeigte, daß in mehr als 50% der untersuchten Tumoren DNA-Verluste auf 1p21-p22, 2q36, 3p, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p13-p21, 10q, 11p12-p14, 11q14-q22, 12q21, 13q, 18q und 21q21 sowie DNA-Gewinne auf 1q, 3q, 5p, 8q, 9q34, 11q13, 12p, 16p, 17q12-q21, 17q24-q25, 19, 20q und 22q zu detektieren sind.

Diese Vielzahl an chromosomalen Veränderungen spiegelt mit großer Wahrscheinlichkeit die Komplexität der genetischen Läsionen in Lungenkarzinomen wider. Einzelne Imbalancen lassen sich gut mit Mutationen bekannter Gene korrelieren, von denen einzelne in Abb. 1 dargestellt sind. So treten häufig Deletionen auf Chromosom 9p bei gleichzeitiger Inaktivierung des p16-Gens auf.

Korrelation Genotyp-Histotyp

Mittlerweile wurden mehrere CGH-Studien an Lungentumoren, insbesondere an Kleinzellern, durchgeführt (Levin et al, 1994; Ried et al, 1994; Petersen et al, 1997),

die neue Kandidatenregionen für Onkogene und Tumorsuppressorgene lieferten.

Die Deletionen auf den Chromosomen 4q, 8p, 11q, und 21q sowie die Überrepräsentationen der Chromosomen 1p, 11q13, 19 und 22q wurden ebenfalls in schlecht-differenzierten Plattenepithelkarzinomen der HNO-Region gefunden (Bockmühl et al, 1996). Mehrere dieser Regionen wurden noch nicht in Lungentumoren beschrieben. Generell zeigen Kopf/Hals-Karzinome ein sehr ähnliches Muster chromosomaler Veränderungen wie Plattenepithel-Karzinome der Lunge, was für eine gute Korrelation zwischen Geno- und Histotyp spricht. Demgegenüber konnten wir zeigen, daß Adenokarzinome eine etwas andere Verteilung der chromosomalen Imbalancen aufweisen (Petersen et al, 1997b; beigefügt).

Auch Überrepräsentationen auf Chromosom 20q waren häufig. Amplifikationen dieses Chromosomenarmes wurden insbesondere in invasiven Adenokarzinomen der Brust beschrieben (Tanner et al, 1994). Das Gen BTAK zeigt in diesen Tumoren gehäuft Amplifikationen und Überexpressionen. Es stellt ebenfalls ein wichtiges Kandidatengen in Lungentumoren dar (siehe unten).

Weiterhin finden sich häufig Verluste von Chromosomenarmen in Kombination mit der Überrepräsentierung des anderen Chromosomenarmes, was der Bildung von Isochromosomen entspricht und insbesondere für die Chromosomen 3, 5 und 8 in Plattenepithelkarzinomen und Kleinzellern beschrieben wurde (Mertens et al, 1994; eigene unpublizierte Ergebnisse).

Im Gegensatz zu publizierten LOH-Untersuchungen, zeigten die CGH-Ergebnisse für einzelne Regionen Überrepräsentationen statt Deletionen. So wurden beispielsweise Allelverluste auf den Chromosomenarmen 1q, 8q und 22q beschrieben (Shiseki et al, 1996; Sato et al, 1994). Diese Daten unterstützen die Bedeutung der komparativen

Hybridisierung als Methode zur Vorcharakterisierung von Kandidatenregionen. Zur näheren Einengung von potentiellen Tumorsuppressor-Regionen ist der Einsatz von LOH-Studien sinnvoll. Dabei sollte aber stets bedacht werden, daß man einen semi-quantitativen Vergleich unterschiedlicher Allele durchführt. Dabei kann eine Imbalanz der Allele einerseits durch den Verlust andererseits aber auch durch den Zugewinn eines Allels verursacht werden. Es ist daher anzunehmen, daß einzelne Regionen, von denen über Allelotypisierungsstudien Deletionen beschrieben wurden, in Wirklichkeit Überrepräsentationen oder Amplifikationen entsprechen.

Mit der Einführung der Histogrammdarstellung konnten erstmals statistische Untersuchungen des generierten Datenmengen durchgeführt werden, was die Korrelation genetischer Veränderungen mit dem Phänotyp ausgewählter Tumorsubgruppen ermöglicht (Petersen et al, 1997b, Bockmühl et al, 1997; Arbeiten sind beigelegt).

Chromosomale Veränderungen metastasierter Karzinome

Allgemein läßt sich feststellen, daß metastasierende Tumoren wesentlich mehr genetische Veränderungen zeigten, als die nicht-metastasierenden. Dies spricht für eine Akkumulation zusätzlicher genetischer Aberrationen im Laufe der Progression durch die ein Tumor bzw. einzelne Zellpopulationen die Fähigkeit zur Dissemination erlangen.

Der statistische Vergleich der metastasierten und nicht-metastasierten Plattenepithelkarzinome der Lunge ergab die signifikante Assoziation des Phänotyps Metastasierung mit Imbalancen der Chromosomenabschnitte 3p12, 4p16, 6p22-p24, 6q24-q27, 8p23, 10q21-q24, 10q26 und 21q22. Einige dieser Regionen wurden

bereits in anderen Neoplasien als progressions-assoziierte Ereignisse beschrieben, was die Hypothese unterstützt, daß es sich bei der Metastasierung nicht um einen gewebe-spezifischen Vorgang handelt und daß die dafür verantwortliche Gene auch in anderen Tumorentitäten eine Rolle spielen.

Deletionen der chromosomalen Bande 4p16 wurden in einer CGH-Studie wesentlich häufiger in Metastasen von Kolorektal-Karzinomen als in den Primärtumoren beobachtet (Paredes-Zaglul et al, 1998). Für die Chromosomen 6q, 8p und 10q gibt es mehrfache Hinweise auf deren Beteiligung an der Metastasierung. Chromosomentransfer-Experimente belegen, daß rekonstituierte menschliche wie auch Hamster-Tumorzellen ein deutlich reduziertes Metastasierungspotential aufweisen (Welch et al, 1994; Ichikawa et al, 1996).

Bezüglich Deletionen auf Chromosom 21q existiert erst eine Studie, in der der Verlust dieses Chromosomenarms statistisch signifikant häufiger in Hirnmetastasen als in primären nichtkleinzelligen Lungentumoren auftrat (Kohno et al, 1998).

Wie bereits erwähnt wurden Deletionen einiger Regionen auf Chromosom 3p insbesondere in frühen Tumorstadien gefunden (Hung et al, 1995). Interessanterweise treten offensichtlich aber auch einige DNA-Verluste erst in fortgeschrittenen Tumoren auf. So ist gerade der Verlust des gesamten Chromosomenarmes 3p einschließlich der Bande 3p12 eine typische Veränderung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, dem Lungentumor mit dem bekanntermaßen höchsten Potential zur Metastasierung.

Auch einige DNA-Überrepräsentationen zeigten statistische Signifikanz in Assoziation mit dem metastatischen Phänotyp, insbesondere 1q21-q25, 8q, 9q34, 11q13 und 15q11-q13. Überrepräsentationen auf Chromosom 1q wurden bereits für metastasierende Nierenzell-Karzinome beschrieben (Gronwald et al, 1997).

Chromosom 8q-Überrepräsentationen und im besonderen Amplifikationen des myc-Onkogens auf 8q24 sind genetische Marker für die Tumorprogression (Brison, 1993). Kürzlich wurden 8q-Überrepräsentationen zusammen mit 8p-Verlusten in Knochenmetastasen von Prostatakarzinomen gefunden (Alers et al, 1997). 11q13-Überrepräsentationen bzw. –Amplifikationen treten insbesondere in nichtkleinzelligen Lungentumoren auf und sind mit einer schlechten Prognose assoziiert (Betticher et al, 1996). Für die Regionen 9q34 und 15q11-q13 wurden bisher keine genetischen Veränderungen im Zusammenhang mit der Progression publiziert.

Der Vergleich der CGH-Daten mit den Allelotypisierungsdaten auf Chromosom 10q, welche an einem ähnlichen Tumorkollektiv durchgeführt wurden, zeigte sowohl eine Übereinstimmung bezüglich der minimal deletierten Regionen, der Gesamt-Inzidenz als auch der statistischen Assoziation mit der Progression bzw. Metastasierung. Diese gute Korrelation unterstreicht die Bedeutung der weiteren gefundenen Regionen. Trotz der Limitation im Auflösungsvermögen der CGH, scheint die Anwendung dieser statistischen Verfahren wichtige Hinweise auf weitere involvierte Regionen zu liefern.

Klonalität

Der Vergleich von Primärtumoren und den korrespondierenden Metastasen zeigte in allen Fällen einen klonalen Zusammenhang der Tumoren. Dies war auch bei einer früheren Studie an kleinzelligen Bronchialkarzinomen und mehreren synchronen Metastasen der Fall (Schwendel et al, 1997). Interessanterweise wird bereits in frühen Stadien der Lungentumorigenese von einer klonalen Streuung ausgegangen, da man dieselben Allelverluste, die zunächst in präneoplastischen Epithelien findet auch später in Primärtumoren detektieren konnte, obwohl diese örtlich und

morphologisch distinkt waren (Hung et al, 1995).

Im Gegensatz dazu zeigen einzelne CGH-Studien anderer Arbeitsgruppen, daß zumindest in einem Teil der Fälle kein klonaler Zusammenhang von Primärtumoren und Metastasen besteht (Kuukasjarvi et al, 1997). Eine mögliche Erklärung könnte die starke Heterogenität der Tumoren sein, die insbesondere bei längeren Latenzperioden zwischen der Resektion des Primärtumors und der Metastasierung die Aufstellung einer genetischen Verwandtschaft erschwert. Es könnte jedoch auch technisch bedingt sein, da diese Untersuchungen vornehmlich an Paraffinmaterial durchgeführt wurden.

Chromosomale Aberrationen in der Tumorprogression

Der Vergleich der Primärtumoren mit den korrespondierenden Metastasen bestätigte die Relevanz der statistisch signifikanten Regionen. Generell waren die gleichen genetischen Veränderungen häufig in den unterschiedlichen Tumoren eines Patienten auffindbar, jedoch in den Metastasen oft stärker ausgeprägt. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, daß aus dem heterogenen Primärtumor insbesondere die Zellen mit einem Wachstumsvorteil herausselektiert und dann in den Metastasen angereichert werden.

Während Primärtumoren häufig Überrepräsentationen von ganzen Chromosomenarmen zeigten, wiesen Metastasen oft Amplifikationen kleinerer chromosomaler Abschnitte auf. Das ist passend zu der Beschreibung, daß Amplifikationen typischerweise in fortgeschrittenen Tumoren auftreten (Brison, 1993). Kleinere interstitielle Deletionen wurden im Laufe der Progression zu Metastasen vergrößert, was vermuten läßt, daß diese einen Triggering-Effekt für die Entstehung

größerer Deletionen darstellen. So treten analog zu Verlusten auf Chromosom 10q zunächst interstitielle Deletionen auf, während in der Progression Verluste ganzer Chromosomenarme oder Chromosomen nachweisbar sind. Solche ausgedehnten Deletionen insbesondere für die Chromosomen 3p und 10q sind ein typisches Charakteristikum von Kleinzellern. Demgegenüber zeigen Plattenepithelkarzinome eher interstitielle Deletionen (Petersen et al, 1998a; beigefügt). Es ist daher zu vermuten, daß der in einzelnen Fällen zu beobachtende morphologische Übergang von einem Plattenepithelkarzinom zu einem Kleinzeller gerade durch den Verlust größerer Chromosomenabschnitte während der Tumorprogression bedingt ist. Ein analoges Verhalten ist beispielsweise bei Hirntumoren bezüglich der Chromosom 10q-Verluste bekannt, wo diese Deletion eindeutig den Übergang von niedriggradigen Astrozytomen zu den maligneren Glioblastomen definiert (Rasheed et al, 1995; Kleihues et al, 1995).

5.2 Genetische Untersuchungen auf Chromosom 10q

Auch in einer Reihe anderer Malignome wurden Allelverluste auf Chromosom 10q als progressions-assoziiert beschrieben, u.a. in Nierenzellkarzinomen (Morita et al, 1991), Non-Hodgkin-Lymphomen (Speaks et al, 1992), Melanomen (Herbst et al, 1994), Prostatakarzinomen (Komiya et al, 1996; Gray et al, 1995) und Blasenkarzinomen (Cappellen et al, 1997).

Die Tatsache, daß in über 94% der Kleinzeller Chromosom 10q-Verluste auftreten, ließ vermuten, daß auch in nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen 10q-Deletionen eine Rolle spielen. Die erste Allelotypisierungsstudie mit zunächst 6 Markern zeigte, daß diese aber vornehmlich in Plattenepithelkarzinomen und Kleinzellern auftreten (Petersen et al, 1998a). Das Deletionsmapping ergab drei minimale Regionen für

potentielle Tumorsuppressorgene. Die Region I bei 10q22-q23 angrenzend an die Marker D10S541, wurde auch in Prostatakarzinomen beschrieben (Gray et al, 1995; Komiya et al, 1996). Ebenso die zweite Region um den Marker D10S185 (Ittmann, 1996). Die am weitesten telomerisch gelegene Region bei 10q26 zeigte am häufigsten Allelverluste, so in Prostatakarzinomen, Endometriumstumoren und Glioblastomen (Ittmann, 1996; Nagase et al, 1996; Rasheed et al, 1995). Auch in Plattenepithelkarzinomen der Kopf-/Hals-Region konnten Deletionen in diesem Bereich nachgewiesen werden (Bockmühl et al, 1997, beigefügt). In Glioblastomen konnten bereits mittels Chromosomentransfer-Experimenten supprimierende Wirkungen nach Induktion von Chromosomenabschnitten 10q24-q26 nachgewiesen werden (Steck et al, 1995). Für Lungentumoren stehen ähnliche Versuche noch aus.

Bislang wurden in unmittelbarer Nähe dieser drei Regionen die Kandidatengene für MXI1, PTEN/MMAC1 und DMBT1 identifiziert.

Das mxi1-Gen konnte mittlerweile als Kandidatengenen in Prostata- als auch Lungenkarzinomen ausgeschlossen werden (Gray et al, 1995; Petersen et al, 1998a).

Das PTEN/MMAC1-Gen, in dem Mutationen in Brust-, Prostata-, Nierenkarzinomen und Hirntumoren beschrieben wurden (Steck et al, 1997; Li et al, 1997), scheint ebenfalls von untergeordneter Bedeutung zu sein (Petersen et al, 1998b; Teng et al, 1997). Interessanterweise wurde es insbesondere in hereditären Krebserkrankungen nachgewiesen, u.a. in Brust- und Schilddrüsentumoren (Lynch et al, 1997). Passend dazu wurde gezeigt, daß Mutationen innerhalb diese Gens das Cowden-Syndrom hervorruft, einer vererbaren Erkrankung, die mit einem erhöhten Risiko einhergeht, Tumoren der Brust, der Schilddrüse und der Haut zu entwickeln (Liaw et al, 1997; Nelen et al, 1997).

Eine Arbeit an einem umfangreichen Kollektiv von Lungentumor-Zelllinien konnte eine Mutationsrate von ca. 10% innerhalb des PTEN/MMAC1-Gene zeigen (Forgacs et al, 1998). Diese Rate ist jedoch nicht sehr hoch, was ebenfalls für die untergeordnete Bedeutung dieses Genes bei Lungentumoren spricht.

Aufgrund seiner Lokalisation auf Chromosom 10q25.3-q26.1 ist DMBT1 ein weiteres Kandidatengen für Lungentumoren. Homozygote Deletionen dieses Gene wurden in Glioblastomen und Medulloblastomen beschrieben (Mollenhauer et al, 1997). Mittlerweile wurden auch weitere Arbeiten publiziert, die auf die Bedeutung dieses Gens in Hirntumoren hinweisen (Maier et al, 1998; Lin et al, 1998). Offensichtlich treten allerdings eher homo- bzw. hemizygote Deletionen auf, Mutationen konnten bisher nicht nachgewiesen werden. Vielmehr scheint das Gen Polymorphismen zu beherbergen (von Deimling, persönliche Kommunikation), was sich mit unseren Daten bei Lungentumoren deckt.

Zusammenfassend scheinen jedoch alle bislang identifizierten Gene auf Chromosom 10q in Lungentumoren nicht die Hauptbedeutung zu haben. So bleibt die Suche nach dem oder den Tumorsuppressorgenen auf Chromosom 10q, die in Lungenkarzinomen von Bedeutung sind, offen.

5.3 Differentielle Genexpression

Wie bereits erwähnt, stehen der umfangreichen Menge cyto- und molekulargenetischer Daten, die Deletionen oder Überrepräsentationen auf DNA-Ebene beschreiben, nur eine Minderheit an erwiesenen Tumorsuppressor- bzw. Onkogenen entgegen. Klassischerweise wurden sogenannte positional cloning-Projekte durchgeführt, um die betroffenen Gene zu identifizieren. Diese erfordern das

Screening umfangreicher Tumorkollektive, um die minimal betroffenen Regionen einzuengen und ein sehr gut sortiertes bzw. kartiertes Kontig an genomischen Klonen, die die zu untersuchende Region überspannen. Diese Projekte sind nach wie vor sehr zeitaufwendig und kompetitiv.

Eine in letzter Zeit immer stärker an Bedeutung gewinnende Methode ist daher die Untersuchung von Expressionsunterschieden in unterschiedlichen zellulären Systemen bzw. Tumoren, und eine Verschiebung der Analyse von DNA zu RNA nach sich ziehen (Sager et al, 1997). Sie werden in großem Stil eingesetzt, u.a. im Cancer Genome Anatomy Project in den USA.

Durch die Erstellung komplexer Transkriptmuster wird einerseits die Identifizierung einzelner Gene wesentlich schneller und effizienter und zweitens, durch die simultane Erfassung vieler Informationen, wird die Identifizierung einer Vielzahl von Faktoren ermöglicht, die in die maligne Transformation involviert sind.

Bislang wurden mehrere Methoden zur Erstellung solcher Transkriptionsunterschiede etabliert, die Differential Display-RT-PCR, welche mittlerweile von neueren und schnelleren Verfahren wie der Subtraktiven Suppressions-Hybridisierung (SSH), der seriellen Genexpressions-Analyse/SAGE (Velculescu et al, 1995) und der Untersuchung mittels cDNA-Microarrays (Skena et al, 1995; DeRisi et al, 1996) abgelöst wurde.

Erste Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Anzahl unterschiedlich exprimierter Gene einige Hundert erreichen wird. Diese Veränderungen fallen in folgende Kategorien: (1) Veränderungen, die unmittelbar in die Induktion oder Aufrechterhaltung von Neoplasien beteiligt sind, (2) Veränderungen, welche Konsequenzen der Entartung, aber nicht dessen Ursache sind, oder (3) Veränderungen, die vollständig unabhängig von Neoplasien sind und stochastische

Veränderungen der Genexpression (interindividuelle Schwankungen) darstellen (Szallasi, 1998).

Im folgenden sollen nur einige wenige der über differentielle Genexpression gefundenen Klone eingegangen werden.

BTAK (breast tumor amplified kinase) ist eine Serin-Threonin-Kinase mit großer Homologie zu den Genen *lpl1* von *S. cerevisiae* und *aurora* von *Drosophila*, denen Bedeutung bei der Chromosomensegregation zukommt (Chan & Botstein et al, 1993; Glover et al, 1995). Dieses Gen wurde kürzlich als das lange gesuchte Onkogen der häufig amplifizierten Region auf Chromosom 20q13 in Brusttumoren identifiziert (Sen et al, 1997). Mittlerweile wurde die Amplifikation und Überexpression auch in anderen Tumoren beschrieben, wie Ovar-, Dickdarm- und Prostatakarzinomen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß es sich bei dem Gen STK15/BTAK um eine Zentrosom-assoziierte Kinase handelt, die beteiligt ist an Verdopplungs- und Verteilungsstörungen (duplication-distribution abnormalities) bei der Zellteilung und somit für Aneuploidien. Die Überexpression sowohl in Maus-NIH 3T3 als auch diploiden humanen Brustepithelzellen führte zum Auftreten abnormer Zentrosomenmengen (Amplifikation), chromosomaler Instabilität und Transformation (Zhou et al, 1998). Die im Vergleich zu normalem Bronchialepithel deutliche Überexpression in den Tumorzellen zusammen mit der Tatsache, daß häufig Überrepräsentationen auf Chromosom 20q auftreten, machen dieses Gen zu einem wichtigen Kandidatengen bei Lungentumoren, die durch eine enorme chromosomale Instabilität gekennzeichnet sind.

Ein weiteres Kandidatengen ist AIM1 auf Chromosom 6q21, einer häufig deletierten Region in Lungentumoren. Es wurde in revertierten malignen Melanom-Zellen gefunden, welche nach Chromosom 6-Transfer die Fähigkeit von anker-

unabhängigem Wachstum und die Tumorigenität in der Nacktmaus verloren hatten (Ray et al, 1996). Die Charakterisierung dieses Genes zeigte es der Familie der β - γ -Kristallin-Superfamilie zugehörig, welche in der Augenlinse zur Aufrechterhaltung der Struktur verantwortlich sind. Die Verbindung anderer Gene dieser Proteinfamilie bei Streßantwort, Differenzierung und Änderung der Zellmorphologie sprechen für eine Interaktion mit dem Zytoskelett (Ray et al, 1997). Die Tatsache, daß auch gehäuft Deletionen in diesem Chromosomenabschnitt in Lungenkarzinomen zu finden sind, und daß es in allen untersuchten Zelllinien deutlich vermindert bzw. überhaupt nicht exprimiert wurde, spricht für seine Bedeutung in der Tumorigenität von Lungentumoren. Es befindet sich zusätzlich in einer chromosomalen Region, die signifikant mit dem metastatischen Phänotyp assoziiert war.

Grb14 wurde als neues Mitglied der GRB7-Familie identifiziert und stellt eine PDGF-regulierte Serin-Kinase dar (Daly et al, 1996). Die chromosomale Lokalisation wurde bislang noch nicht ermittelt. Die fehlende Expression dieses Gens in normalem Lungengewebe und Überexpression in den untersuchten Lungentumorzellen macht es zu einem weiteren interessanten Kandidatengen.

HMG (high mobility group)-Proteine gehören zu Nicht-Histon-Proteinen, die in drei Klassen unterteilt werden. Die HMG-1 ist ein konserviertes nukleäres Protein und hat strukturelle Aufgaben der Chromatin-Organization (Falciola et al, 1997). Eine Beteiligung von HMG-1-Proteinen an der Tumorigenese wurde von Xiang et al, 1997 vorgeschlagen. Sie fanden eine deutliche Überexpression in gastrointestinalen Adenokarzinomen im Vergleich zur korrespondierenden normalen Mukosa. Dieses Gen war ebenfalls in der untersuchten Lungenadenokarzinom-Zelllinie stark überexprimiert.

Ein weiteres in den Bibliotheken kloniertes Gen, was in allen untersuchten

Lungentumorzelllinien verlorenen war, ist p51. Es kodiert ein Homologes von p53 und dem später isolierten p73. Fehlende Expression sowie vereinzelte Mutationen wurden in einigen epithelialen Tumoren gefunden (Osada et al, 1998). Die Bedeutung dieses Genes insbesondere im Zusammenhang mit der Expression bzw. Mutation von p53 bleibt noch zu klären.

Veränderte Interaktionen der Tumorzelle mit der extrazellulären Matrix treten in mehreren Stadien der Metastasierung auf. Dies erfordert zelluläre Rezeptoren, insbesondere Integrine, welche an die extrazelluläre Matrix binden, z.B. Fibronectin. Wir fanden Fibronectin und seinen Rezeptor in der untersuchten Tumorzelllinie deutlich herabreguliert. Das Glykoprotein Fibronectin spielt eine Schlüsselrolle im adhäsiven und migratorischen Verhalten von Zellen, wie Embryonalentwicklung, Hämostase und Wundheilung sowie onkogener Transformation und Metastasierung (Hynes, 1990).

Neoplastische Zellen synthetisieren Fibronectin in geringeren Mengen als normale. Sie sind unfähig, Fibronectin für die effiziente Adhäsion auszubilden (Akiyama et al, 1995). Die stabile Transfektion von Fibronectin in die stark-metastasierende Maus-Mamma-Karzinom-Zelllinie LMM3 resultierte in reduziertem Metastasierungspotential (Urtreger et al, 1998; Werbajh et al, 1998).

Der Abbau extrazellulärer Matrix durch Matrix-Metalloproteinasen, Serin-Proteasen und Cystein-Aspartyl-Proteasen ist ein weiterer wichtiger Aspekt in der Tumorinvasion und Metastasierung. U-PA (urokinase-type plasminogen activator), ein Mitglied der Serin-Protease-Familie, konvertiert Plasminogen in die aktive Form Plasmin, welches zahlreiche Komponenten der extrazellulären Matrix und der Basalmembran abbaut (Robbins et al, 1967; Liotta et al, 1981; Goldfarb et al, 1986). Die Aktivität von u-PA ist reguliert durch Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren, so z.B.

die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren 1 und 2. In malignen Tumoren fand sich eine erhöhte Expression von u-PA und PAI-1, welche mit der Invasivität korreliert war (Noguchi-Takino et al, 1996). Reduzierte Expression von PAI-2 wurde in Lungentumoren signifikant mit lymphogener Metastasierung und schlechter Prognose assoziiert (Yoshino et al, 1998). Wir konnten einen Verlust der PAI-2-Expression ebenfalls in unserem Versuchsansatz nachweisen.

Thrombospondin-1 (TSP-1) ist ein Glykoprotein, das nach Thrombin-Stimulation von α -Granula der Thrombocyten freigesetzt wird und ebenfalls eine transiente Extrazellulär-Matrix-Komponente in sich entwickelnden und regenerierenden Geweben darstellt. TSP-1 agiert als Zell-Adhäsionsmolekül, moduliert die Zell-Bewegung, das Neuritenwachstum und die Angiogenese (Adams, 1997). TSP-1 wird durch Wildtyp-p53 reguliert. Der Verlust von funktionell-aktivem p53 führt zu reduzierter Expression von TSP-1. Somit beruht eine tumor-supprimierende Aktivität von p53 auf der Stimulation des Angiogenese-Inhibitor TSP-1 (Dameron et al, 1994).

Thrombospondin 1 gehörte zu den am häufigsten gefundenen Genen in der II. Bibliothek und war in den Tumorzellen deutlich reduziert exprimiert.

Diese Auswahl an Genen, die in den Bibliotheken kloniert wurden, macht deutlich, daß das gewählte Modell durchaus geeignet ist, neue Tumor- bzw. Progressions-assoziierte Gene zu identifizieren. Die Komplexität der Veränderungen während der Tumorigenese, Progression und Metastasierung wird durch die Vielzahl der Gene aus den unterschiedlichen Bereichen deutlich. Sie umfassen Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktions-Faktoren, zytoskelettale Proteine, DNA-Reparatur-Enzyme, Angiogenesefaktoren, Zell-Extrazellulär-Matrix-Interaktionen und viele weitere mehr.

Wie gezeigt, korrelieren sie zum Teil mit den häufig alterierten chromosomalen Regionen, was auf die Möglichkeit der Identifizierung von Kandidatengenen für die

häufig alterierten Regionen hinweist. Das kann zum einen erfolgen über die Homologie zu bereits kartierten und sequenzierten genomischen Klonen oder über das Kartieren der klonierten cDNA-Fragmente.

Es werden mittels dieser Technik allerdings auch solche Gene erfaßt, welche nicht durch DNA-Mutationen de-reguliert sind, sondern auf Transkriptionsebene reguliert werden. Das kann u.a. über Hypermethylierung der Promotor-Region erfolgen, wie es beim p16-Gen der Fall ist. Über das legigliche Screening von Onko- und Tumorsuppressorgenen auf DNA-Ebene werden diese Gene nicht identifiziert.

Die Tatsache, daß lediglich 40% der klonierten Sequenzen Homologien zu bereits bekannten Genen und vollständigen cDNA-Sequenzen ohne bekannte Funktion zeigen auf die noch zu leistende Arbeit hinsichtlich Identifizierung von Tumor-assoziierten Genen.

5.4 Gen für das Calcyclin-bindende Protein

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bereits ein neues Gen auf Chromosom 1q24-q25 näher charakterisiert werden, welches das Calcyclin-bindende Protein kodiert. Es zeigte Überexpression sowie Rearrangements auf DNA-Ebene in Lungentumor-Zelllinien. Da diese Region auch in Primärtumoren häufig alteriert ist, stellt es ein neues Kandidatengen für die Überrepräsentation auf Chromosom 1q24 dar. Bislang gibt es noch keine Arbeiten, die auf die Funktion dieses Genes im Menschen hindeuten. Das Protein ist ursprünglich in der Maus auf der Suche nach Bindungspartnern von Calcyclin kloniert worden (Filipek & Kuznicki, 1998). Obwohl auch die Funktion von Calcyclin noch nicht genau geklärt ist, konnte die Induktion durch Serum, PDGF und EGF nachgewiesen werden (Calabretta et al, 1986a und b).

Ebenso konnte die Bindung an Calcium und eine daraus resultierende Konformationsänderung gezeigt werden (Filipek et al, 1990; Potts et al, 1995). Die Menge an Calcyclin-mRNA wurde ebenfalls erhöht durch NGF (nerve growth factor), durch Retinoinsäure und durch ras-Transformation (Leonard et al, 1987; Thompson & Ziff, 1989; Tonini et al, 1991; Guo et al, 1990; Chambers & Tuck 1993). Diese Beobachtungen deuten auf eine mögliche Funktion innerhalb der Signaltransduktionskaskade hin. Interessanterweise zeigt das Calcyclin-bindende Protein mehrere Phosphorylierungsstellen sowie eine Kernlokalisationsdomäne. Die Funktion dieses Gens bzw. Proteins bleibt jedoch noch zu klären.

Die Überexpression von Calcyclin sowie Amplifikationen wurden in einer Reihe epithelialer Tumoren nachgewiesen, u.a in Plattenepithelkarzinomen des Mundes, in Melanomen und Hauttumoren (Berta et al, 1997; Weterman et al, 1993; van Groningen et al, 1995; Brinck et al, 1995).

5.5 Ausblick

Die bislang vorliegenden CGH-Daten weisen darauf hin, daß sich dem Muster chromosomaler DNA-Imbalancen von Karzinomen des Respirationstraktes bestimmte Phänotypen zuordnen lassen. In Zukunft bleibt noch zu klären, wie prädiktiv diese Veränderungen sind und welche genetische Zusatzuntersuchungen sich sinnvoll in der Diagnostik einsetzen lassen, doch erscheint eine genetische Klassifikation prinzipiell möglich. Die den chromosomalen Veränderungen zugrundeliegenden und mit ihnen assoziierten genetischen Defekte sind zu einem Großteil noch nicht identifiziert und charakterisiert. Die bislang klonierten Sequenzen sollen unter Berücksichtigung ihrer chromosomalen Lokalisation die Grundlage für die Identifizierung weiterer Kandidatengene in der Tumorigenese von

Lungentumoren bilden. Das Fernziel ist die Zusammenstellung eines Musters von Genen, dessen Analyse eine Aussage über das Tumorverhalten erlaubt. Technisch ist dabei die Erstellung von Filtern mit den häufig alterierten Genen vorstellbar, auf die entweder genomische DNA oder cDNA der zu untersuchenden Tumoren hybridisiert werden können. Die Notwendigkeit solcher Zusatzuntersuchungen ist gerade bei der großen Gruppe der nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen gegeben, da die konventionellen morphologischen Methoden nur sehr eingeschränkt eine Aussage über Prognose und biologisches Verhalten erlauben.

6 Zusammenfassung

Um chromosomale Veränderungen, die mit dem metastatischen Phänotyp assoziiert sind, zu identifizieren, wurde die komparative genomische Hybridisierung an Plattenepithelkarzinomen der Lunge durchgeführt. Insgesamt wurden 64 Tumoren von 50 Patienten, darunter je 25 mit bzw. ohne Hinweis auf Metastasierung untersucht. In 10 Fällen wurden Primärtumoren und mindestens eine korrespondierende Metastase analysiert. Deletionen wurden in mehr als 50% der Fälle beobachtet auf den Chromosomen 1p, 2q, 3p, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 10q, 11, 12q, 13q, 18q und 21q mit einem Maximum der Inzidenzen bei 1p21-p22, 2q36, 3p12-p14, 3p21-p23, 4p14-p15, 9p13-p21, 11p12-p14, 11q14-q22, 12q21 und 21q21. DNA-Überrepräsentierungen fanden sich vor allem in den chromosomalen Bereichen 1q, 3q, 5p, 8q, 9q34, 11q13, 12p, 16p, 17q12-q21, 17q24-q25, 19, 20q und 22q. Der statistische Vergleich zwischen den metastasierten und nicht-metastasierten Plattenepithelkarzinomen in Form eines χ^2 -Tests legte nahe, daß die Deletionen der Banden 3p12, 4p16, 6p22-p24, 6q24-q27, 8p21-p23, 10q21-q24, 10q26 und 21q22 sowie die DNA-Gewinne bei 1q21-q25, 8q, 9q34, 11q13 und 15q11-q13 signifikant mit dem Phänotyp der Metastasierung assoziiert waren. Der Vergleich der Primärtumoren mit den synchronen Metastasen zeigte in allen Fällen einen klonalen Zusammenhang und bestätigte in Einzelfällen die statistische Analyse der Tumorgruppen.

Allelotypisierungsstudien an 22 Kleinzellern (SCLC), 40 Plattenepithelkarzinomen, 11 Adenokarzinomen, 4 großzelligen Lungenkarzinomen sowie einem Karzinoid mit 6 polymorphen Markern zeigten Allelverluste (LOH) in 91% der SCLC und 56% der metastasierenden Plattenepithelkarzinome. Während nicht-metastasierte Plattenepithelkarzinome lediglich in 14% einen LOH zeigten, war kein Allelverlust in

den übrigen nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen detektierbar. Die Assoziation mit der Metastasierung und Progression war statistisch hochsignifikant. Die Deletionskartierung der minimal betroffenen Regionen auf Chromosom 10q bei Plattenepithelkarzinomen ergab drei minimale Regionen flankiert von den Markern Afm086/D10S541 (10q23), D10S185 (10q23) und D10S1782/D10S169 (10q26) definieren. Die insgesamt sehr gute Korrelation beider Untersuchungsmethoden spricht für die Validität der CGH-Ergebnisse insgesamt. Über weitere genetische Analysen mittels SSCP, DNA Sequenzierung, Southern-, Northern-Blotting und RT-PCR zeigte sich, daß die bereits bekannten Kandidatengene MXI1, PTEN/MMAC1 und DMBT1 nur eine untergeordnete Rolle in der Tumورprogression von Lungenkarzinomen spielen.

Um neue Kandidatengene in der Lungenkrebsprogression zu identifizieren, wurde die subtraktive Suppressions-Hybridisierung (SSH) eingesetzt. Dabei erfolgte der Expressionsvergleich von einer metastasierten Adenokarzinom-Zelllinie mit einer Primärkultur von normalen Lungenepithelzellen. Es wurden zwei Bibliotheken kloniert mit vornehmlich herauf- bzw. herabregulierten Genen, die insgesamt 752 Klone umfaßten. Die bereits sequenzierten 457 zeigten in weniger als 40% der Fälle Homologien zu bereits bekannten Genen. Die Überprüfung der Fragmente im Northern Blot zeigte eine Differentialität in 30-40% der untersuchten Klone.

Die Northern Blot-Analyse von drei dieser Fragmente ergab ähnliche Expressionsunterschiede in weiteren Tumor-Zelllinien, was für die generelle Bedeutung der klonierten Fragmente in Lungenkarzinomen spricht.

Es konnte die gesamte cDNA-Sequenz und die genomische Struktur für das Calcyclin-bindende Protein auf Chromosom 1q24-q25 identifiziert werden, daß in allen untersuchten Lungenkarzinom-Zelllinien überexprimiert und auf DNA-Ebene

überrepräsentiert war. Die Fluoreszenz-in situ- Hybridisierung ergab Rearrangements dieses genomischen Abschnittes.

Abkürzungen

ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CCD	charge coupled device
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DABCO	4,6-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanosintriphosphat
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. Coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamin-tetra-acetat
ERBB2	Avian erythroblastic leukemia viral oncogene
FHIT	Fragile Histidino Triad-Genprodukt
FITC	Streptavidin-Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
GDP	Guanosintriphosphat
Grb/GRB	Growth factor receptor-bound
GT	Guanidiniumisothiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
L15	Leibovitz 15
LB	Luria-Bertoni-Nährmedium

LCNEC	Großzelliges neuroendokrines Karzinom
MOPS	3-(N-Morpholino)-propanylsulfonsäure
NSCLC	Nichtkleinzellige Lungenkarzinome
PBS	Phosphat-gepufferte Saline-Lösung
PHA	Phythämagglutinin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCLC	Kleinzellige Lungenkarzinome
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOS	Son of sevenless
SP1	Stimulierendes Protein 1
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Lösung
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Lösung
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Antidigoxigenin-Tetrarhodamin-Isothiocyanat
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Literaturverzeichnis

Adams JC (1997) Thrombospondin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 29: 861-865

Akiyama SK, Olden K & Yamada KM (1995) Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 14: 173-189

Alers JC, Krijtenburg PJ, Rosenberg C, Hop WC, Verkerk AM, Schroder FH, van der Kwast TH, Bosman FT & van Dekken H (1997) Interphase cytogenetics of prostatic tumor progression: specific chromosomal abnormalities are involved in metastasis to the bone. *Lab Invest* 77: 437-448

Alroy I & Yarden Y (1997) *The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. FEBS Lett* 410: 83-86

Antoniades HN, Galanopoulos T, Neville-Golden J & O'Hara CJ (1992) *Malignant epithelial cells in primary human lung carcinomas coexpress in vivo platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs and their protein products. Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3942-3946

Bennett WP, Colby TV, Travis WD, Borkowski A, Jones Rt, Lane DP, Metcalf RA, Samet JM, Takeshima Y, Gu JR, Vähäkangas KH, Soini Y, Pääkkö P, Welsh JA & Harris CC (1993) *p53 protein accumulates frequently in early bronchial neoplasia. Cancer Res* 53: 4817-4822

Berta GN, Ghezzi F, D'Avolio A, Zulian P, Carbone V, Racca S, Vercellino V & Di Carlo F (1997) *Enhancement of calcyclin gene RNA expression in squamous cell carcinoma of the oral mucosa, but not in benign lesions. J Oral Pathol Med* 26: 206-210

- Betticher DC, Heighway J, Hasleton PS, Altermatt HJ, Ryder WD, Cerny T & Thatcher N (1996) Prognostic *significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer*. *Br J Cancer* 73: 294-300
- Birchmeier C & Gherardi E (1998) Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol* 8: 404-410
- Bockmühl U, Schwendel A, Dietel M & Petersen I (1996) Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 56: 5325-5329
- Bonomi P (1996) Non-small cell lung cancer chemotherapy, In: Pass HI, Mitchell JB, Johnson DH and Turrisi AT (eds) *Lung Cancer: Principles and Practice*. Philadelphia, Lippincott, p.811
- Brambilla A, Negoescu A, Gazzeri S, Lantuejoul S, Moro D, Brambilla C & Coll JL (1996) Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *Am J Pathol* 149: 1941-1952
- Brinck U, Gabius HJ, Zeng FY, Gerke V, Lazarou D, Zografakis C, Tsambaos D & Berger H (1995) Differential expression of calcyclin and its accessible ligands in various types of cutaneous tumors. *J Dermatol Sci* 10: 181-190
- Brison O (1993) Gene amplification and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 1155: 25-41
- Brodt P (1996) *Cell adhesion and invasion in cancer metastasis*, pp. 167-242,

Landes, austin and Spronger, Berlin (1996)

Cagle PT, El-Naggar AK, Xu HJ, Hu SX & Benedict WF (1993) Differential retinoblastoma protein expression in neuroendocrine tumors of the lung. Potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 150: 393-400

Calabretta B, Battini R, Kaczmarek L, de Riel JK & Baserga R (1986a) Molecular cloning of the cDNA for a growth factor-inducible gene with strong homology to S-100, a calcium-binding protein. *J Biol Chem* 261: 12628-12632

Calabretta B, Venturelli D, Kaczmarek L, Narni F, Talpaz M, Anderson B, Beran M & Baserga R (1986b) Altered expression of G1-specific genes in human malignant myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 1495-1498

Cappellen D, Gil Diez de Medina S, Chopin D, Thiery JP & Radvanyi F (1997) Frequent loss of heterozygosity on chromosome 10q in muscle-invasive transitional cell carcinomas of the bladder. *Oncogene* 14: 3059-3066

Caporaso NE, Hayes RB, Dosemici M, Hoover R, Ayesh R, Hetzel M & Idle J (1989) Lung cancer risk, occupational exposure, and the debrisoquine metabolic phenotype. *Cancer Res* 49: 3675

Chambers AF & Tuck AB (1993) Ras-responsive genes and tumor metastasis. *Crit Rev Oncog* 4: 95-114

Chan CS & Botstein D (1993) Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics* 135: 677-691

Chung GTY, Sudaresan V, Hasleton P, Rudd R, Taylor R & Rabbitts PH (1995)

Sequential molecular genetic changes in lung cancer development. *Oncogene* 11: 2591-2598

Clements NC, Nelson MA, Wymer JA, Savage C, Aquirre M & Garewal H (1995) Analysis of K-ras gene mutations in malignant and non-malignant endobronchial tissue obtained by fiberoptic bronchoscopy. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 1374-1378

Daly RJ, Sanderson GM, Janes PW & Sutherland RL (1996) Cloning and characterization of GRB14, a novel member of the GRB7 gene family. *J Biol Chem* 271: 12502-12510

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA & Bouck N (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265: 1582-1584

Damstrup L, Rygaard K, Spang-Thomsen M & Poulsen HS (1992) Expression of the epidermal growth receptor in human small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 52: 3089-3093

Denissenko MF, Pao A, Tang M & Pfeifer GP (1996) Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274: 430-432

DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA & Trent JM (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14: 457-460

De Vita VT, Hellmann S & Rosenberg SA (1997) *Cancer: Principle and Practice of Oncology*, 5. Ausgabe, Vol. 1, Lippincott-Raven, Philadelphia & New York, USA

- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED & Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6025-6030
- Drabkin HA, Mendez MJ, Rabbitts PH, Varkony T, Bergh J, Schlessinger J, Erickson P & Gemmill RM (1992) Characterization of the submicroscopic deletion in the small-cell lung carcinoma (SCLC) cell line U2020. *Genes Chromosomes Cancer* 5: 67-74
- Du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schröck E, Popp S, Döhner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P & Cremer T (1993) Detection of complete and partial chromosome gain and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum Genet* 90: 590-610
- Eerola AK, Törmänen U, Rainio R, Sormunen R, Bloigu R, Vähäkangas K, Lehto VP, Soini Y & Pääkkö P (1997) Apoptosis in operated small cell lung carcinoma is inversely related to tumor necrosis and p53 immunoreactivity. *J Pathol* 181: 172-177
- Falciola L, Spada F, Calogero S, Langst G, Voit R, Grummt I & Bianchi ME (1997) High mobility group 1 protein is not stably associated with the chromosomes of somatic cells. *J Cell Biol* 137: 19-26
- Fathi Z, Way JW, Corjay MH, Viallet J, Sausville EA & Battey JF (1996) Bombesin receptor structure and expression in human lung carcinoma cell lines. *J Cell Biochem Suppl* 24: 237-246
- Filipek A & Kuznicki J (1998) Molecular cloning and expression of a mouse brain

cDNA encoding a novel protein target of calyculin. *J Neurochem* 70:1793-1798

Fong KM, Biesterveld EJ, Virmani A, Wistuba I, Sekido Y, Bader SA, Ahmadian M, Ong ST, Rassool FV, Zimmermann PV, Giaccone G, Gazdar AF & Minna JD (1997) FHIT and FRA3B 3p14.2 allele loss are common in lung cancer and preneoplastic bronchial lesions and are associated with cancer-related FHIT cDNA splicing aberrations. *Cancer Res* 57: 2256-2267

Fontanini G, Vignati S, Bigini D, Mussi A, Lucchi M, Angeletti CA, Basolo F & Bevilacqua G (1995) Bcl-2 protein: a prognostic factor inversely correlated to p53 in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 71: 1003-1007

Forgacs E, Biesterveld EJ, Sekido Y, Fong K, Muneer S, Wistuba II, Milchgrub S, Brezinschek R, Virmani A, Gazdar AF & Minna JD (1998) Mutation analysis of the PTEN/MMAC1 gene in lung cancer. *Oncogene* 17: 1557-1565

Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA & Parry H (1995) Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* 81: 95-105

Goldfarb RH, Murano G, Brundage R, Siegal GP, Terranova V, Garbisa S & Liotta LA (1986) Degradation of glycoprotein and collagenous components of the basement membrane: studies with urokinase-type plasminogen activator, alpha-thrombin, and plasmin. *Semin Thromb Hemost* 12: 335-336

Grandori C & Eisenman RN (1997) Myc target genes. *Trends Biochem Sci* 22: 177-181

Gray IC, Phillips SM, Lee SJ, Neoptolemos JP, Weissenbach J & Spurr NK (1995) Loss of the chromosomal region 10q23-25 in prostate cancer. *Cancer Res* 55:

Graziano SL (1997) Non-small cell lung cancer: clinical value of new biological predictors. *Lung Cancer* 17: S37-S58

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M & Harris CC (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-4878

Gronwald J, Storkel S, Holtgreve-Grez H, Hadaczek P, Brinkschmidt C, Jauch A, Lubinski J & Cremer T (1997) Comparison of DNA gains and losses in primary renal clear cell carcinomas and metastatic sites: importance of 1q and 3p copy number changes in metastatic events. *Cancer Res* 57: 481-487

Guo XJ, Chambers AF, Parfett CL, Waterhouse P, Murphy LC, Reid RE, Craig AM, Edwards DR & Denhardt DT (1990) Identification of a serum-inducible messenger RNA (5B10) as the mouse homologue of calcyclin: tissue distribution and expression in metastatic, ras-transformed NIH 3T3 cells. *Cell Growth Differ* 1: 333-338

Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J, Gazdar AF, Minna JD & Kaye FJ (1988) Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. *Science* 241: 353-357

Herbst RA, Weiss J, Ehnis A, Cavenee WK & Arden KC (1994) Loss of heterozygosity for 10q22-10qter in malignant melanoma progression. *Cancer Res* 54: 3111-3114

Hibi K, Takahashi T, Yamakawa K, Ueda R, Sekido Y, Ariyoshi Y, Suyama M, Takagi H, Nakamura Y & Takahashi T (1992) Three distinct regions involved in 3p

deletion in human lung cancer. *Oncogene* 7: 445-449

Hirano T, Franzén B, Kato H, Ebihara Y & Auer G (1994) Genesis of squamous cell carcinoma. Sequential changes of proliferation, DNA ploidy, and p53 expression. *Am J Pathol* 144: 296-302

Horowitz JM, Park SH, Bogenmann E, Cheng JC, Yandell DW, Kaye FJ, Minna JD, Dryja TP & Weinberg RA (1990) Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2775-2779

Hung J, Kishimoto Y, Sugio K, Virmani A, McIntire DD, Minna JD & Gazdar AF (1995) Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. *J Am Med Assoc* 273: 558-563

Hynes R (1990) *Fibronectins*. Springer-Verlag, New York

Ichikawa T, Nihei N, Kuramochi H, Kawana Y, Killary AM, Rinker-Schaeffer CW, Barrett C, Isaacs JT, Kugoh H, Oshimura M & Shimazaki J (1996) Metastasis suppressor genes for prostate cancer. *The Prostate Supplement* 6: 31-35

Ittmann M (1996) Allelic loss on chromosome 10 in prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 56: 2143-2147

Jiang SX, Kameya T, Sato Y, Yanase N, Yoshimura H & Kodama T (1996) Bcl-2 protein expression in lung cancer and close correlation with neuroendocrine differentiation. *Am J Pathol* 148: 837-846

Jiang SX, Sato Y, Kuwao S & Kameya T (1995) Expression of bcl-2 oncogene

protein is prevalent in small cell lung carcinomas. *J Pathol* 177: 135-138

Kaiser U, Schili M, Haag U, Neumann K, Kreipe H, Kogan E & Havemann K (1996) Expression of bcl-2-protein in small cell lung cancer. *Lung Cancer* 15: 31-40

Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F & Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818-821

Kayser K, Andre S, Bovin NV, Zeng FY & Gabius HJ (1997) Preneoplasia-associated expression of calcyclin and of binding sites for synthetic blood group A/H trisaccharide-exposing neoglycoconjugates in human lung. *Cancer Biochem Biophys* 15: 235-243

Kishimoto Y, Sugio K, Hung JY, Virmani AK, McIntire DD, Minna JD & Gazdar AF (1995) Allele-specific loss in chromosome 9p loci in preneoplastic lesions accompanying non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 87: 1224-1229

Kitagawa Y, Wong F, Lo P, Elliott M, Verburgt LM, Hogg JC & Daya M (1996) Overexpression of Bcl-2 and mutations in p53 and K-ras in resected human non-small cell lung cancers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 45-54

Kleihues P, Soylemezoglu F, Schauble B, Scheithauer BW & Burger PC (1995) Histopathology, classification, and grading of gliomas. *Glia* 15: 211-221

Kohno T, Kawanishi M, Matsuda S, Ichikawa H, Takada M, Ohki M, Yamamoto T & Yokota J (1998) Homozygous deletion and frequent allelic loss of the 21q11.1-q21.1 region including the ANA gene in human lung carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 21: 236-243

- Komiya A, Suzuki H, Ueda T, Yatani R, Emi M, Ito H & Shimazaki J (1996) Allelic losses at loci on chromosome 10 are associated with metastasis and progression of human prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 17: 245-253
- Konishi T, Lin Z, Fujino S, Kato H & Mori A (1997) Association of p53 protein expression in stage I lung adenocarcinoma with reference to cytological subtypes. *Hum Pathol* 28: 544-548
- Konishi H, Takahashi T, Kozaki KI, Yatabe Y, Mitsudomi T, Fujii Y, Sugiura T, Matsuda H, Takahashi T & Takahashi T (1998) Detailed deletion mapping suggests the involvement of a tumor suppressor gene at 17p13.3, distal to p53, in the pathogenesis of lung cancers. *Oncogene* 17: 2095-2100
- Krystal GW, Birrer M, Way J, Nau M, Sausville E, Thompson C, Minna JD & Battey J (1988) Multiple mechanisms for transcriptional regulation of the myc gene family in small-cell lung cancer. *Mol Cell Biol* 8: 3373-3381
- Krystal GW, Hines SJ & Organ CP (1996) Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-kit and stem cell factor. *Cancer Res* 56: 370-376
- Kuukasjarvi T, Karhu R, Tanner M, Kahkonen M, Schaffer A, Nupponen N, Pennanen S, Kallioniemi A, Kallioniemi OP & Isola J (1997) Genetic heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 57: 1597-1604
- Latif F, Tory K, Modi WS, Graziano SL, Gamble G, Douglas J, Heppell-Parton, Rabbitts PH, Zbar B & Lerman MI (1992) Molecular characterization of a large homozygous deletion in the small cell lung cancer cell line U2020: a strategy

for cloning the putative tumor suppressor gene. *Genes Chromosomes Cancer* 5: 119-127

Leonard DG, Ziff EB & Greene LA (1987) Identification and characterization of mRNAs regulated by nerve growth factor in PC12 cells. *Mol Cell Biol* 7: 3156-3167

Levin NA, Brzoska P, Gupta N, Minna JD, Gray JW & Christman MF (1994) Identification of frequent novel genetic alterations in small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 54: 5086-5091

Liaw D, Marsh DJ, Li J, Dahia PL, Wang SI, Zheng Z, Bose S, Call KM, Tsou HC, Peacocke M, Eng C & Parsons R (1997) Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat Genet* 16: 64-67

Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH & Parsons R (1997) PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 275: 1943-1947

Lin H, Bondy ML, Langford LA, Hess KR, Delclos GL, Wu X, Chan W, Pershouse MA, Yung WK & Steck PA (1998) Allelic deletion analyses of MMAC/PTEN and DMBT1 loci in gliomas: relationship to prognostic significance. *Clin Cancer Res* 4: 2447-2454

Liotta LA, Goldfarb RH, Brundage R, Siegal GP, Terranova V & Garbisa S (1981) Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res* 41: 4629-4636

- Li S, Rosell R, Urban A, Font A, Ariza A, Armengol P, Abad A, Navas JJ & Monzo M (1994) K-ras gene point mutation: a stable tumor marker in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 11: 19-27
- Li ZH, Zheng J, Weiss LM & Shibata D (1994) c-k-ras and p53 mutations occur very early in adenocarcinomas of the lung. *Am J Pathol* 144: 303-309
- Lynch ED, Ostermeyer EA, Lee MK, Arena JF, Ji H, Dann J, Swisshelm K, Suchard D, MacLeod PM, Kvinnsland S, Gjertsen BT, Heimdal K, Lubs H, Moller P & King MC (1997) Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, cowden disease, and juvenile polyposis. *Am J Hum Genet* 61: 1254-1260
- Maier D, Zhang Z, Taylor E, Hamou MF, Gratzl O, Van Meir EG, Scott RJ & Merlo A (1998) Somatic deletion mapping on chromosome 10 and sequence analysis of PTEN/MMAC1 point to the 10q25-26 region as the primary target in low-grade and high-grade gliomas. *Oncogene* 16: 3331-3335
- Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB & Sidransky D (1995) 5'CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Med* 1: 686-692
- Mertens F, Johansson B & Mitelman F (1994) Isochromosomes in neoplasia. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 221-230
- Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, von Deimling A & Poustka A (1997) DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is deleted in malignant brain

tumors. *Nature Gen* 17: 32-39

Morita R, Saito S, Ishikawa J, Ogawa O, Yoshida O, Yamakawa K & Nakamura Y (1991) Common regions of deletion on chromosomes 5q, 6q, and 10q in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 51: 5817-5820

Nagase S, Sato S, Tezuka F, Wada Y, Yajima A & Horii A (1996) Deletion mapping on chromosome 10q25-q26 in human endometrial cancer. *Br J Cancer* 74: 1979-1983

Nelen MR, van Staveren WC, Peeters EA, Hassel MB, Gorlin RJ, Hamm H, Lindboe CF, Fryns JP, Sijmons RH, Woods DG, Mariman EC, Padberg GW & Kremer H (1997) Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Hum Mol Genet* 6: 1383-1387

Nishio M, Koshikawa T, Kuroishi T, Suyama M, Uchida K, Takagi Y, Washimi O, Sugiura T, Ariyoshi Y, Takahashi T, Ueda R & Takahashi T (1996) Prognostic significance of abnormal p53 accumulation in primary, resected non-small cell lung cancers. *J Clin Oncol* 14: 497-502

Noguchi-Takino M, Endo Y, Yonemura Y & Sasaki T (1996) Relationship between expression of plasminogen activator system and metastatic ability in human cancers. *Int J Oncol* 8: 97-105

Nuorva K, Soini Y, Kamel D, Autio-Harmainen H, Risteli L, Vähäkangas K & Pääkkö P (1993) Concurrent p53 expression in bronchial dysplasias and squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* 142: 725-732

Olivero M, Rizzo M, Madeddu R, Casadio C, Pennacchietti S, Nicotra MR, Prat M, Maggi G, Arena N, Natali PG, Comoglio PM & Di Renzo MF (1996)

Overexpression and activation of hepatocyte growth factor/scatter factor in human non-small cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 74: 1862-1868

Ooi WL, Elston RC, Chen VW, Bailey-Wilson JE & Rothschild H (1986) Increased familial risk for lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 76: 217-222

Osada M, Ohba M, Kawahara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I, Ikawa Y, Nimura Y, Nakagawara A, Obinata M & Ikawa S (1998) Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med* 4: 839-843

Otterson GA, Khleif SN, Chen W, Coxon AB & Kaye FJ (1995) CDKN2 gene silencing in lung cancer by DNA hypermethylation and kinetics of p16INK4 protein induction by 5-aza 2'-deoxycytidine. *Oncogene* 11: 1211-1216

Paredes-Zaglul A, Kang JJ, Essig YP, Mao W, Irby R, Wloch M & Yeatman TJ (1998) Analysis of colorectal cancer by comparative genomic hybridization: evidence for induction of the metastatic phenotype by loss of tumor suppressor genes. *Clin Cancer Res* 4: 879-886

Peeper DS, Upton TM, Ladha MH, Neumann E, Zalvide J, Bernhards R, DeCaprio JA & Ewen ME (1997) Ras signaling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein. *Nature* 382: 88-90

Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, Reichel MB, Ried T & Dietel M (1997) Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p. *Br J Cancer* 75: 79-86

Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, Harris A, Gatter

- KC & Mason DY (1993) bcl-2 protein in non-small cell lung carcinoma. *New Engl J Med* 329: 690-694
- Potts BC, Smith J, Akke M, Macke TJ, Okazaki K, Hidaka H, Case DA & Chazin WJ (1995) The structure of calyculin reveals a novel homodimeric fold for S100 Ca(2+)-binding proteins. *Nat Struct Biol* 2: 790-796
- Rabbitts P, Bergh J, Douglas J, Collins F & Waters J (1990) A submicroscopic homozygous deletion at the D3S3 locus in a cell line isolated from a small cell lung carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2: 231-238
- Rachwal WJ, Bongiorno PF, Orringer MB, Whyte RI, Ethier SP & Beer DG (1995) Expression and activation of erbB-2 and epidermal growth factor receptor in lung adenocarcinomas. *Br J Cancer* 72: 56-64
- Rasheed BK, McLendon RE, Friedman HS, Friedman AH, Fuchs HE, Bigner DD & Bigner SH (1995) Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 10: 2243-2246
- Ray ME, Su YA, Meltzer PS & Trent JM (1996) Isolation and characterization of genes associated with chromosome-6 mediated tumor suppression in human malignant melanoma. *Oncogene* 12: 2527-2533
- Ray ME, Wistow G, Su YA, Meltzer PS & Trent JM (1997) AIM1, a novel non-lens member of the $\beta\gamma$ -crystallin superfamily, is associated with the control of tumorigenicity in human malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 3229-3234
- Reissmann PT, Koga H, Takahashi R, Figlin RA, Holmes EC, Piantadosi S, Cordon-Cardo C & Slamon DJ (1993) Inactivation of the retinoblastoma susceptibility

- gene in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 8: 1913-1919
- Richardson GE & Johnson BE (1993) The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 20: 105-127
- Ried T, Petersen I, Holtgreve-Grez H, Speicher MR, Schrock E, du Manoir S & Cremer T (1994) Mapping of multiple DNA gains and losses in primary small cell lung carcinomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 54: 1801-1806
- Robbins KC, Summaria L, Hsieh B & Shah RJ (1967) The peptide chains of human plasmin, mechanism of activation system of human plasminogen to plasmin. *J Biol Chem* 242: 2333-2342
- Rodenhuis S & Slebos RJ (1992) Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 52: 2665s-2669s
- Rosell R, Li S, Skacel Z, Mate JL, Maestre J, Canela M, Tolosa E, Armengol P, Barnadas A & Ariza A (1993) Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Oncogene* 8: 2407-2412
- Roth K, Wolf G, Dietel M & Petersen I (1997) Image analysis for Comparative Genomic Hybridization (CGH) based on a karyotyping program for Windows. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 19: 461-474
- Rusch V, Baselga J, Cordon-Cardo C, Orazem J, Zaman M, Hoda S, McIntosh J, Kurie J & Dmitrovsky E (1993) Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res* 53: 2379-2385

- Rusin MR, Okamoto A, Chorazy M, Czyzewski K, Harasim J, Spillare EA, Hagiwara K, Hussain SP, Xiong Y, Demetrick DJ & Harris CC (1996) Intragenic mutations of the p16INK4, p15INK4B and p18 genes in primary non-small-cell lung cancers. *Int J Cancer* 65: 734-739
- Sager R (1997) Expression genetics in cancer: shifting the focus from DNA to RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 952-955
- Sato S, Nakamura Y & Tsuchiya E (1994) Difference of allelotype between squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res* 54: 5652-5655
- Schena M, Shalon D, Davis RW & Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-4670
- Schneider PM, Hung MC, Chiocca SM, Manning J, Zhao X, Fang K & Roth JA (1989) Differential expression of the c-erbB-2 gene in human small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 49: 4968-4971
- Schwartz AG, Yang P & Swanson GM (1996) Familial risk of lung cancer among nonsmokers and their relatives. *Am J Epidemiol* 144: 554-562
- Schwendel A, Langreck H, Reichel M, Schröck E, Ried T, Dietel M & Petersen I (1997) Primary small cell lung carcinomas and their metastases are characterized by a recurrent pattern of genetic alterations. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 74: 86-93

Sekido Y, Fong KM & Minna JD (1998) Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1378: F21-F59

Sekido Y, Takahashi T, Ueda R, Takahashi M, Suzuki H, Nishida K & Tsukamoto T (1993) Recombinant human stem cell factor mediates chemotaxis of small-cell lung cancer cell lines aberrantly expressing the c-kit protooncogene. *Cancer Res* 53: 1709-1714

Sellers TA, Bailay-Wilson JE, Elston RC, Wilson AF, Elston GZ, Ooi WL & Rothschild H (1990) Evidence for mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 82: 1272-1279

Sen S, Zhou H & White RA (1997) A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene* 14: 2195-2200

Shapiro GI, Edwards CD, Kobzik L, Godleski J, Richards W, Sugarbaker DJ & Rollins BJ (1995) Reciprocal RB inactivation and p16INK4 expression in primary lung cancers and cell lines. *Cancer Res* 55: 505-509

Shaw GL, Falk RT, Deslauriers J, Frame JN, Nesbitt JC, Pass HI, Issaq HJ, Hoover RN & Tucker MA (1995) Debrisoquine metabolism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4: 41-48

Shi D, He G, Cao S, Pan W, Zhang HZ, Yu D & Hung MC (1992) Overexpression of the c-erbB-2/neu-encoded p185 protein in primary lung cancer. *Mol Carcinogen* 5: 213-218

Shields PG & Harris CC (1993) Genetic predisposition to cancer, In: Roth JA, Cox JD

and Hong WK (eds) *Lung Cancer*. Boston, Blackwell, p.3

Shimizu T & Sekiya T (1995) Loss of heterozygosity at 9p21 loci and mutations of the MTS1 and MTS2 genes in human lung cancers. *Int J Cancer* 63: 616-620

Shiseki M, Kohno T, Adachi J, Okazaki T, Otsuka T, Mizoguchi H, Noguchi M, Hirohashi S & Yokota J (1996) Comparative allelotype of early and advanced stage non-small cell lung carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 17:71-77

Siegfried JM, Weissfeld LA, Singh-Kaw P, Weyant RJ, Testa JR & Landreneau RJ (1997) Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 57: 433-439

Slebos RJC, Evers SG, Wagenaar SS & Rodenhuis S (1989) Cellular protooncogenes are infrequently amplified in untreated non-small cell lung cancer (NSCLC). *Br J Cancer* 59: 76-80

Smith AL, Hung J, Walker L, Rogers TE, Vuitch F, Lee E & Gazdar AF (1996) Extensive areas of aneuploidy are present in the respiratory epithelium of lung cancer patients. *Br J Cancer* 73: 203-209

Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, Tornielli S, Pilotti S, De Gregorio L, Pastorino U, Pierotti MA, Ohta M, Huebner K & Croce CM (1996) The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 85: 17-26

Speaks SL, Sanger WG, Masih AS, Harrington DS, Hess M & Armitage JO (1992) Recurrent abnormalities of chromosome bands 10q23-25 in non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 5: 239-243

- Steck PA, Ligon AH, Cheong P, Yung WK & Pershouse MA (1995) Two tumor suppressive loci on chromosome 10 involved in human glioblastomas. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 255-261
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH & Tavtigian SV (1997) Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15: 356-362
- Sugio K, Kishimoto Y, Virmani AK, Hung JY & Gazdar AF (1994) K-ras mutations are a relatively late event in the pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 54: 5811-5815
- Sundaresan V, Ganly P, Hasleton P, Rudd R, Sinha G, Bleehe NM & Rabbitts P (1992) p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumors, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Oncogene* 7: 1989-1997
- Szallasi Z (1998) Gene expression patterns and cancer. *Nat Biotechnology* 16: 1292-1293
- Tamura K, Zhang X, Murakami Y, Hirohashi S, Xu HJ, Hu SX, Benedict WF & Sekiya T (1997) Deletion of three distinct regions on chromosome 13q in human non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer* 74: 45-49
- Tanaka H, Fujii Y, Hirabayashi H, Miyoshi S, Sakaguchi M, Yoon HE & Matsuda H (1998) Disruption of the RB pathway and cell-proliferative activity in non-small-cell lung cancers. *Int J Cancer* 79: 111-115
- Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Collins C, Stokke T, Karhu R, Kowbel D,

- Shadravan F, Hintz M, Kuo WL, Waldman FM, Isola JJ, Gray GW & Kallioniemi OP (1994) Increased copy number at 20q13 in breast cancer: defining the critical region and exclusion of candidate genes. *Cancer Res* 54: 4257-4260
- Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S & Sugimachi K (1990) Immunohistochemical evidence of autocrine growth factors in adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res* 50: 7077-7080
- Thompson MA & Ziff EB (1989) Structure of the gene encoding peripherin, an NGF-regulated neuronal-specific type III intermediate filament protein. *Neuron* 2: 1043-1053
- Todd S, Franklin WA, Varella-Garcia M, Kennedy T, Hilliker Jr C, Hahner L, Anderson M, Wiest JS, Drabkin HA & Gemmill RM (1997) Homozygous deletions of human chromosome 3p in lung tumors. *Cancer Res* 57: 1344-1352
- To-Figueras J, Gene M, Gomez J, Galan C, Firvida J, Fuentes M, Rodamilans M, Huguet E, Estape J & Corbella J (1996) Glutathione M1 and codon 72p53 polymorphisms in a northwestern Mediterranean population and their relation to lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5: 337-342
- Tonini GP, Casalaro A, Cara A & Di Martino D (1991) Inducible expression of calcyclin, a gene with strong homology to S-100 protein, during neuroblastoma cell differentiation and its prevalent expression in Schwann-like cell lines. *Cancer Res* 51: 1733-1737
- Urtreger A, Porro F, Puricelli L, Werbajh S, Baralle FE, Bal de Kier Joffe E, Kornblihtt AR & Muro AF (1998) Expression of RGD minus fibronectin that does not form extracellular matrix fibrils is sufficient to decrease tumor metastasis. *Int J*

Cancer 78: 233-241

van Groningen JJ, Weterman MA, Swart GW & Bloemers HP (1995) Functional analysis of the human calcyclin gene promoter in a panel of human melanoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 1122-1131

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B & Kinzler KW (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487

Viallet J & Sausville EA (1996) Involvement of signal transduction pathways in lung cancer biology. *J Cell Biochem Suppl* 24: 228-236

Washimi O, Nagatake M, Osada H, Ueda H, Koshikawa T, Seki T, Takahashi T & Takahashi T (1995) In vivo occurrence of p16 (MTS1) and p15 (MTS2) alterations preferentially in non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 55: 514-517

Weiner DB, Nordberg J, Robinson R, Nowell PC, Gazdar A, Greene MI, Williams WV, Cohen JA & Kern JA (1990) Expression of the neu gene-encoded protein (P185neu) in human non-small cell carcinomas of the lung. *Cancer Res* 50: 421-425

Welch DR, Chen P, Miele ME, McGary CT, Bower JM, Weissman BE & Stanbridge EJ (1994) Microcell-mediated transfer of chromosome 6 into metastatic human C8161 melanoma cells suppresses metastasis but does not inhibit tumorigenicity. *Oncogene* 9: 255-262

Werbajh SE, Urtreger AJ, Puricelli LI, de Lustig ES, Bal de Kier Joffe E & Kornblihtt AR (1998) Downregulation of fibronectin transcription in highly metastatic adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 440: 277-281

- Weterman MA, van Muijen GN, Bloemers HP & Ruiter DJ (1993) Expression of calcyclin in human melanocytic lesions. *Cancer Res* 53: 6061-6066
- Williams DE, Pairolero PC, Davis C, Bernatz PE, Payne WS, Taylor WF, Uhenhopp MA & Fontana RS (1981) Survival of patients surgically treated for stage I lung cancer. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 82: 70-76
- Xiang YY, Wang DY, Tanaka M, Suzuki M, Kiyokawa E, Igarashi H, Naito Y, Shen Q & Sugimura H (1997) Expression of high-mobility group-1 mRNA in human gastrointestinal adenocarcinoma and corresponding non-cancerous mucosa. *Int J Cancer* 74: 1-6
- Xu HJ, Hu SX, Cagle PT, Moore GE & Benedict WF (1991) Absence of retinoblastoma protein expression in primary non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 51: 2735-2739
- Xu HJ, Quinlan DC, Davidson AG, Hu SX, Summers CL, Li J & Benedict WF (1994) Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 86: 695-699
- Yoshino H, Endo Y, Watanabe Y & Sasaki T (1998) Significance of plasminogen activator inhibitor 2 as a prognostic marker in primary lung cancer: association of decreased plasminogen activator inhibitor 2 with lymph node metastasis. *Br J Cancer* 78: 833-839
- Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR & Sen S (1998) Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet* 20: 189-193

Danksagung

Hiermit danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, Brigitte und Bernd Bräuer, die mir durch ihre große Unterstützung sehr geholfen haben und es mir ermöglichen, mich voll auf meine Arbeit konzentrieren zu können.

Nicole Deutschmann, Jacqueline Rudolf und Christa Schütze danke ich für ihre Zuarbeit im Labor. Ebenso möchte ich den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe danken, insbesondere Dr. Karsten Schlüns und Dr. Günter Wolf.

Prof. Reinhold Schäfer und Dr. Christine Sers bin ich dankbar für stets verfügbare konstruktive fachliche Diskussionen und Dr. Oleg Tchernitsa für die praktische Hilfe bei der Erstellung der Genbibliotheken.

Unserem Institutsdirektor Prof. Manfred Dietel danke ich für die Bereitstellung technischer und materieller Voraussetzungen zur Durchführung der Arbeit.

Weiterhin danke ich allen Kollegen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, und die ich hier nicht namentlich erwähnt habe.

Meinem Mann, Dr. Iver Petersen, danke ich für die Unterstützung bei der Konzipierung und Anfertigung meiner Doktorarbeit und den mir dabei eingeräumten Freiraum.

Erklärung über die Selbständigkeit bei der Anfertigung der Arbeit

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, daß die vorgelegte Dissertation ohne fremde Hilfe verfaßt wurde, und daß die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sowie die Literatur vollständig angegeben wurden.

Publikationsliste

Petersen S, Aninat-Meyer M, Schlüns K, Gellert K, Dietel M, Petersen I (1999) Chromosomal alterations in the clonal evolution to the metastatic stage of squamous cell carcinomas of the lung. *Br J Cancer*, in press

Petersen I, Bockmühl U, Petersen S, Wolf G, Dietel M (1998) Patterns of chromosomal imbalances in carcinomas of the respiratory tract. *Gene Therapy of Cancer*, Plenum Press, New York, 2: 9-16

Petersen S, Rudolf J, Bockmühl U, Gellert K, Wolf G, Dietel M, Petersen I (1998) Distinct regions of allelic imbalance on chromosome 10q22-q26 in squamous cell carcinomas of the lung. *Oncogene* 17:449-454

Petersen S, Wolf G, Bockmühl U, Gellert K, Dietel M, Petersen I (1998) Allelic loss on chromosome 10q in human lung cancer: association with tumour progression and metastatic phenotype. *Br J Cancer* 77:270-276

Petersen S, Saretzki G, von Zglinicki T (1998) Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Exp Cell Res* 239:152-160

Petersen I, Petersen S, Bockmühl U, Schwendel A, Wolf G, Dietel M (1997) Comparative genomic hybridization of bronchial carcinomas and their metastases. *Verh Dtsch Ges Pathol* 81:297-305

Bockmühl U, Petersen S, Schmidt S, Wolf G, Jahnke V, Dietel M, Petersen I (1997) Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and nonmetastasizing primary head and neck carcinomas. *Cancer Res* 57:5213-5216

Petersen I, Bujard M, Petersen S, Wolf G, Goeze A, Schwendel A, Langreck H, Gellert K, Reichel M, Just K, du Manoir S, Cremer T, Dietel M, Ried T (1997) Patterns of chromosomal imbalances in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 57:2331-2335